



Etude de la jonction neuromusculaire dans la sclérose latérale amyotrophique

Gaëlle Bruneteau

► To cite this version:

Gaëlle Bruneteau. Etude de la jonction neuromusculaire dans la sclérose latérale amyotrophique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066097 . tel-01138452

HAL Id: tel-01138452

<https://theses.hal.science/tel-01138452>

Submitted on 2 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale : ED3C - Cerveau, cognition, comportement

**Etude de la jonction neuromusculaire
dans la Sclérose Latérale Amyotrophique**

Par Gaëlle BRUNETEAU
Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Daniel HANTAI

Présentée et soutenue publiquement le 31 mars 2014

Devant un jury composé de :

Monsieur Frédéric CHARBONNIER	Professeur des Universités	Rapporteur
Monsieur Jean POUGET	Professeur des Universités, Praticien Hospitalier	Rapporteur
Monsieur François COURAUD	Professeur des Universités	Examineur
Monsieur Laurent SCHAEFFER	Professeur des Universités	Examineur
Monsieur Vincent MEININGER	Professeur des Universités, Praticien Hospitalier	Examineur
Monsieur Daniel HANTAI	Directeur de Recherche	Directeur de thèse
Madame Jeanine KOENIG	Professeur émérite	Membre invité

*A Bassem,
A Sami et Inès,
A tout ceux qui me sont chers, ma famille, mes amis,
en témoignage de ma grande affection.*

Statistiquement tout s'explique, personnellement tout se complique (Daniel Pennac)

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire du Professeur Bertrand Fontaine au CRICM, sous la direction du Docteur Daniel Hantaï.

Je souhaiterais tout d'abord remercier le Professeur Bertrand Fontaine pour m'avoir permis de mener à bien mes travaux de recherche au sein de son laboratoire et pour ses précieux conseils à chaque étape de ce travail.

Je tiens par ces quelques mots à remercier profondément le Docteur Daniel Hantaï pour m'avoir accueillie au sein du "groupe jonction neuromusculaire" et m'avoir guidée tout au long de la préparation puis de la réalisation de ce travail de recherche.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse:

- *les Professeurs Frédéric Charbonnier et Jean Pouget pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse;*
- *les Professeurs François Couraud, Vincent Meininger et Laurent Schaeffer qui ont examiné mon travail.*

Je souhaiterais de surcroît remercier ici le Professeur Vincent Meininger pour m'avoir accueillie en 2002 au sein du centre SLA de la Pitié-Salpêtrière et m'avoir permis de développer cette thématique de recherche. Tous mes remerciements s'adressent également au Docteur Lucette Lacomblez pour m'avoir fait profiter de son expérience lors des (multiples) recherches de financement et autres demandes de promotion qui ont été le (long) préalable indispensable à la réalisation de cette étude...

Au sein de notre laboratoire, je voudrais remercier tout particulièrement Stéphanie Godard-Bauché qui a été présente à tous les stades de cette "grande aventure". Merci à toi Stéph pour m'avoir prise sous ton aile et m'avoir formée sur le plan technique, mais aussi pour nos "petits cafés" et nos discussions à bâtons rompus sur la morphologie de la jonction et ces fameux "oursins"..

Je souhaite aussi adresser mes très sincères remerciements au Professeur Jeanine Koenig pour tout ce qu'elle m'a appris sur la jonction neuromusculaire en particulier et la neurobiologie en général. Jeanine, merci pour tes cours sur la jonction neuromusculaire, ton investissement dans ce projet, et aussi pour nos débats parfois enflammés mais, au final, toujours constructifs.

Je remercie également le Professeur Emmanuel Fournier pour avoir accepté d'assurer l'encadrement de la partie électrophysiologique de ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de mon amitié.

Merci à tous les membres du labo, pour avoir toujours gardé un œil bienveillant sur le bon déroulement de mes manip. Merci encore à Nathalie Mandjee, qui est partie relever d'autres défis professionnels: sans ton énergie et ton enthousiasme, cette étude n'aurait jamais pu démarrer dans d'aussi bonnes conditions !

Mes remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe médicale du centre SLA de Paris: les Docteurs François Salachas, Pierre-François Pradat, Nadine Le Forestier et Timothée

Lenglet. Je souhaiterais tout particulièrement remercier les Docteurs François Salachas et Pierre-François Pradat, dont j'ai partagé le bureau au sein du centre SLA pendant près de 10 ans. François, merci pour ton soutien amical et tes conseils précieux depuis ... tant d'années qu'on ne les compte plus ! Merci également à toi Pierre-François (PF pour les intimes), pour tes conseils toujours avisés. Soyez tous les deux assurés de ma profonde amitié. Un très grand merci également à l'ensemble de l'équipe paramédicale du centre SLA de la Pitié-Salpêtrière et à celle du réseau SLA-Ile de France. La prise en charge des patients atteints de SLA ne peut être qu'un travail d'équipe et c'est aussi votre aide qui m'a permis de mener de front activité clinique et activité de recherche pendant toutes ces années.

Ce travail n'a pu se faire que grâce à de précieuses collaborations. Je tiens en premier lieu à remercier le Docteur Thomas Simonet du Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule dirigé par le Professeur Laurent Schaeffer à l'ENS de Lyon, pour la réalisation des analyses moléculaires. Merci également à Emmanuelle Girard pour son aide dans ce projet.

Je souhaiterais remercier l'ensemble de l'équipe de l'Unité de Morphologie Neuromusculaire de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière pour leur très enrichissante collaboration. Merci à Guy Brochier pour les magnifiques images obtenues en microscopie électronique. Merci au Docteur Edoardo Malfatti et au Docteur Norma Romero pour le temps qu'ils ont bien voulu accorder à l'analyse morphométrique des prélèvements musculaires. J'adresse également mes sincères remerciements au Professeur Michel Fardeau pour son analyse critique des résultats de l'étude morphologique des jonctions neuromusculaires. Un grand merci également à l'ensemble des techniciennes de l'Unité pour leur aide à toutes les étapes !

Je remercie également très sincèrement Marie-Laure Tanguy, biostatisticienne à l'Unité de Recherche Clinique de la Pitié-Salpêtrière, dont la collaboration a été déterminante.

Je souhaite aussi adresser ici mes sincères remerciements au Professeur Bruno Eymard, coordonnateur du centre de référence de pathologie neuromusculaire Paris-Est, pour avoir soutenu ce projet depuis son origine.

Enfin, ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans la collaboration des Docteurs Anthony Behin (centre de référence de pathologie neuromusculaire Paris-Est, Hôpital Pitié-Salpêtrière); Frédéric Khiami et Hedi Sari-Ali (Service d'Orthopédie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière) qui ont réalisé les biopsies musculaires; et celle de l'ensemble de l'équipe du Centre d'Investigation Clinique de la Pitié-Salpêtrière coordonnée par le Professeur Jean-Christophe Corvol. Tous mes remerciements en particulier à Madame Christine Rémy, cadre supérieure, et à Geoffrey Edouart et Géraldine Gourbil, infirmiers au CIC, qui ont assuré avec brio l'organisation pratique de cette étude.

I. RESUME

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une affection neurodégénérative touchant les motoneurones, habituellement mortelle en 3 à 5 ans. La cause de la maladie n'est pas connue et le seul traitement actuellement disponible ne permet qu'un allongement modeste de la survie. Des altérations fonctionnelles de la jonction neuromusculaire (JNM) ont été rapportées dans la SLA mais leur origine physiopathologique n'est pas connue.

Nous avons étudié les JNM chez 11 patients atteints de SLA, en associant étude morphologique en microscopie confocale et analyse ultrastructurale. L'analyse fonctionnelle réalisée en EMG de surface retrouvait une anomalie de transmission neuromusculaire (décrément > 10%) chez 45% des patients. Des altérations morphologiques des JNM étaient visibles chez tous les patients, y compris au stade précoce de la maladie. Associé aux anomalies en rapport avec le phénomène de dénervation, nous avons observé un aspect anormal de spiculation de la gouttière primaire dans environ un tiers des cas. Une interposition marquée de la cellule de Schwann terminale entre la terminaison nerveuse et la membrane postsynaptique, pouvant altérer la transmission synaptique, était parfois visible. Nous avons objectivé une réinnervation compensatrice significativement plus importante chez les patients présentant une SLA d'évolution lente et montré que certains facteurs moléculaires musculaires comme l'histone déacétylase 4 pourraient jouer un rôle crucial dans la capacité de réinnervation.

Ce travail a mis en évidence des altérations morphologiques majeures au niveau des JNM des patients atteints de SLA et a permis d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

II. ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disorder affecting motor neurons, usually leading to death in 3 to 5 years. The only treatment currently available, riluzole, has a modest effect on survival. Functional alterations of the neuromuscular junction (NMJ) have been reported in ALS, but their pathophysiological significance remains unknown.

We studied the morphology of neuromuscular junctions in muscle samples collected from 11 ALS patients, using confocal and electron microscopy. Functional analysis of the NMJs was performed using surface-recording of compound motor action potentials after repetitive nerve stimulation at slow stimulus rate. A significant decrement ($>10\%$), suggesting impairment of the neuromuscular transmission, was present in 45% of the patients. Morphological alterations of the NMJs were present in all ALS patients even at the early-stages. Beside denervation-induced morphological changes, one third of the NMJs showed abnormal spike-like areas of the outer edge of the postsynaptic primary gutter. A marked interposition of the terminal Schwann cell between the nerve terminal and the postsynaptic membrane, which was likely to alter synaptic transmission, was sometimes present. We found a significantly greater compensatory reinnervation in muscle from patients with slowly progressive ALS. Furthermore, we identified that the muscle molecular factor histone deacetylase 4 could play a key role in muscle reinnervation and disease progression in patients with ALS.

This work has highlighted the presence of major morphological changes at the NMJs of ALS patients and identified potential new targets for future treatment.

III. TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	3
I. RESUME	5
II. ABSTRACT.....	6
III. TABLE DES MATIERES.....	7
IV. LISTE DES ABBREVIATIONS	12
V. LISTE DES FIGURES	14
VI. LISTE DES TABLEAUX	15
VII. LISTE DES ANNEXES.....	15
VIII. INTRODUCTION.....	16
IX. ETAT DE LA QUESTION	17
PREMIERE PARTIE : LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE.....	17
1. Rappels sur l'organisation de la motricité.....	17
1.1 Généralités.....	17
1.2 Différents types de motoneurones.....	19
1.2.1 Cortex moteur primaire : cellules pyramidales de Betz.....	19
1.2.2 Moelle épinière.....	19
1.3 L'unité motrice	20
2. La jonction neuromusculaire squelettique	20
2.1 Les différents éléments de la jonction neuromusculaire.....	21
2.1.1 La terminaison nerveuse du motoneurone alpha.....	21
2.1.2 La fibre musculaire squelettique	21
2.1.3 La cellule de Schwann	23
2.1.4 La lame basale synaptique	24
2.2 La transmission synaptique au niveau de la jonction neuromusculaire	24
2.2.1 Séquence des phénomènes durant la transmission neuromusculaire.....	24
2.2.2 Potentiel de plaque motrice miniature.....	25
2.2.3 Potentiel de plaque motrice (ou potentiel postsynaptique excitateur)	25
2.3 Formation de la jonction neuromusculaire.....	25
2.3.1 La différenciation présynaptique.....	26
2.3.2 La différenciation postsynaptique	27
2.4 Maturation et maintenance de la jonction neuromusculaire.....	28
DEUXIEME PARTIE : LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE	29
1. Données épidémiologiques.....	29
1.1 Incidence	29
1.2 Clusters géographiques : l'exemple des indiens Chamorros de l'Ile de Guam.....	29
1.3 Vétérans de la guerre du Golfe	30
1.4 Facteurs de risque	30
2. Neuropathologie	32

2.1 La perte en motoneurones : un marqueur histopathologique essentiel	32
2.2 Une pathologie "multisystémique"	32
2.3 Corps d'inclusion intraneuronaux.....	33
2.3.1 Inclusions positives pour l'ubiquitine : un marqueur neuropathologique de la SLA	33
2.3.2 Corps de Bunina.....	34
2.3.3 Anomalies neurofilamentaires.....	34
2.3.4 Composants protéiques des inclusions : un lien entre génétique et neuropathologie.....	34
3. Données Cliniques	36
3.1 Présentation clinique habituelle	36
3.2 Critères diagnostiques	38
3.2.1 Critères de l'El Escorial révisés	38
3.2.2 Elargissement des critères diagnostiques : les critères d'Awaji.....	41
3.2.3 Diagnostics différentiels	42
3.3 Signes cliniques inhabituels.....	42
3.4 Formes cliniques	44
3.4.1 Formes à début spinal	44
3.4.2 Formes bulbaires.....	44
3.4.3 Formes "respiratoires"	44
3.4.4 Les autres maladies du motoneurone apparentées à la SLA	44
3.5 Evolution	46
3.5.1 Evaluation clinique de la progression	46
3.5.2 Variabilité évolutive	47
3.5.3 Facteurs pronostiques	48
3.5.4 Survie prolongée ("long-term survivors").....	48
4. Génétique	48
4.1 Gène Superoxyde dismutase 1.....	49
4.2 Gène TAR DNA-binding protein.....	50
4.3 Gène Fused in sarcoma.....	51
4.4 Chromosome 9 open reading frame 72.....	53
4.5 SLA "sporadiques"	54
Cas particulier de la mutation C9ORF72.....	57
5. Physiopathologie de la SLA	57
5.1 Principaux modèles animaux	57
5.1.1 Mutant ciblés.....	58
5.1.2 Mutants spontanés.....	61
5.2 Hypothèses physiopathologiques	62
5.2.1 Excitotoxicité, anomalies du calcium et du glutamate	63
5.2.2 Anomalies du stress oxydatif.....	64
5.2.3 Dysfonctionnement mitochondrial.....	64
5.2.4 Neuroinflammation.....	65
5.2.5 Apoptose	65
5.2.6 Anomalies du transport axonal	66

5.2.7 Agrégats protéiques - dérégulation du métabolisme des ARN	67
5.2.8 Anomalies du métabolisme énergétique.....	68
TROISIEME PARTIE : ALTERATIONS DE LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE DANS LA SLA	69
1. Modèles animaux.....	69
1.1 Altérations morphologiques précoces des jonctions neuromusculaires dans le modèle SOD.....	69
1.1.1 La SLA : une axonopathie distale ?.....	69
1.1.2 Sélectivité initiale de l'atteinte pour les unités motrices de type Fast-Fatigable.....	70
1.2 Autres modèles animaux de maladie du motoneurone	71
1.3 Etudes électrophysiologiques de la transmission neuromusculaire chez l'animal	71
1.4 La dimension musculaire de la maladie : le muscle est-il à l'origine d'une déstabilisation de la JNM ?.....	72
1.4.1 L'atteinte des JNM peut-elle être initiée par l'expression de la mutation SOD1 dans le muscle ?	73
1.4.2 L'expression musculaire de Nogo-A pourrait avoir un rôle toxique sur la jonction neuromusculaire dans la SLA.....	73
2. Modifications morphologiques et fonctionnelles de la JNM chez les patients atteints de SLA	74
2.1 Etudes morphologiques de la JNM	74
2.2 Enregistrements de la TNM en ENMG de surface	75
2.3 Enregistrements microélectrophysiologiques de la TNM.....	77
3. Synthèse et objectifs du travail de thèse.....	78
X. PATIENTS ET METHODES	79
1. Patients et témoins	79
2. Evaluation des patients.....	79
2.1 Clinique	79
2.2 Biologique	80
2.3 Analyses génétiques	80
3. Analyse de la transmission neuromusculaire en ENMG de surface	80
3.1 Stimulation nerveuse répétitive à basse fréquence	80
3.2 Test d'effort maximal bref	80
4. Analyse morphologique de la JNM sur biopsie de muscle	81
4.1 Prélèvement musculaire.....	81
4.2 Etude morphologique de la JNM	81
4.2.1 Etude topographique de la JNM.....	81
4.2.2 Etude ultrastructurale de la JNM.....	82
5. Analyse des gènes musculaires potentiellement impliqués dans le processus de réinnervation.....	82
6. Analyse morphométrique et histochimique des fibres musculaires.....	83
7. Analyses statistiques	83
XI. RESULTATS	85
ANALYSE MORPHOLOGIQUE ET FONCTIONNELLE DES JNM DANS LA SLA	85
1. Données cliniques.....	85
2. Etude de la transmission neuromusculaire en ENMG de surface.....	88
2.1 Stimulation nerveuse répétitive à 3Hz.....	88
2.1.1 Principes d'analyse.....	88
2.1.2 Résultats.....	88
Evolution entre M0 et M3.....	89

<i>Comparaison entre les 2 groupes de patients</i>	91
2.2 Tests d'effort maximal bref	91
2.2.1 Principes d'analyse	91
2.2.2 Résultats	91
3. Analyse de l'organisation topographique des JNM en microscopie confocale	92
3.1 Mise en évidence des cholinestérases	92
3.2 Modifications morphologiques du versant postsynaptique	92
3.2.1 Modifications en rapport avec la dénervation	94
3.2.2 Quantification de la fragmentation	94
3.2.3 Aspect de "spiculation"	96
<i>Comparaison des 2 groupes de patients</i>	97
3.3 Analyse de l'innervation	100
3.3.1 Analyse quantitative de la réinnervation	100
3.3.2 Caractéristiques de l'innervation chez les patients atteints de SLA	104
<i>Comparaison des 2 groupes de patients</i>	106
3.4 Morphologie de la cellule de Schwann terminale	106
<i>Comparaison des 2 groupes de patients</i>	107
3.5 Corrélations entre les anomalies morphologiques des JNM et les données cliniques et électrophysiologiques	109
3.5.1 Modifications du versant postsynaptique	109
3.5.2 Innervation	110
3.5.3 Résultats électrophysiologiques	110
4. Analyse ultrastructurale des JNM	110
4.1 Modifications de l'innervation	110
4.2 Modifications du compartiment postsynaptique	111
4.3 La cellule de Schwann terminale	114
5. Analyse morphométrique et histochimique des fibres musculaires	114
PUBLICATION N°1 : ETUDE DE LA REINNERVATION CHEZ LES PATIENTS SLA "SURVIVANTS A LONG TERME"	115
1. Résumé	115
2. Publication n°1 : Muscle histone deacetylase 4 up-regulation in amyotrophic lateral sclerosis: potential role in reinnervation ability and disease progression	116
PUBLICATION N°2 : CARACTÉRISATION MORPHOLOGIQUE DE LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE SLA	117
1. Résumé	117
2. Publication n°2: A comprehensive study of neuromuscular junction morphology in patients with amyotrophic lateral sclerosis: major structural alterations are present from the early stage of the disease	118
XII. DISCUSSION GENERALE	119
Caractérisation morphologique des JNM dans la SLA	119
Le processus de réinnervation collatérale dans la SLA	123
La cellule de Schwann terminale	131
Etude fonctionnelle des JNM	133
XIII. CONCLUSION	136
XIV. BIBLIOGRAPHIE	137

XV. ANNEXES.....	162
------------------	-----

IV. LISTE DES ABBREVIATIONS

Ac	Anticorps
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
AFB	Atrophie Focale Bénigne
ALSFRS-R	Echelle ALS Functional Rating Scale révisée
α -BGT	α -bungarotoxine
AMP	Atrophie Musculaire Progressive
BChE	Butyrylcholinestérase
C9ORF72	Chromosome 9 open reading frame 72
DFT	Démence Fronto-Temporale
ENMG	Electro-neuro-myogramme
FUS	Fused in Sarcoma
FF	Fast-Fatigable
FGFBP1	Fibroblast Growth Factor Binding Protein 1
FR	Fast-Fatigue Resistant
HDAC	Histone Déacétylase
JNM	Jonction Neuromusculaire
MNC	Motoneurone Central
MND	Motoneuron Degeneration
MNP	Motoneurone Périphérique
MuSK	Muscle Specific Kinase
ND	Non Déterminé
PBP	Paralysie Bulbaire Progressive
PB	Phénylbutyrate de sodium
pmn	Progressive motor neuronopathy
ppm	Potentiel de plaque motrice
ppmm	Potentiel de plaque motrice miniature
PUM	Potentiel d'Unité Motrice
RACH	Récepteur à l'Acétylcholine
RT-qPCR	Reverse Transcription, quantitative real-time Polymerase Chain Reaction
S	Slow
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique

SLP	Sclérose Latérale Primitive
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNR	Stimulation Nerveuse Répétitive
SOD1	Superoxide Dismutase 1
SPE	Sciatique Poplitée Externe
TARDBP	TAR DNA-binding protein
TDP43	TAR DNA-binding protein 43
TNM	Transmission Neuromusculaire
TSA	Trichostatine A
UM	Unité Motrice
VPA	Acide Valproïque

V. LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Trajet des voies pyramidales

Figure 2 : Organisation topographique de la jonction neuromusculaire

Figure 3 : Jonction neuromusculaire humaine adulte observée en microscopie électronique

Figure 4 : Modèle d'organisation séquentielle de la spécialisation présynaptique

Figure 5 : Mécanismes physiopathologiques identifiés dans le modèle SOD1

Figure 6 : Révélation de l'activité cholinestérasique et expression des 2 cholinestérases

Figure 7 : Microscopie confocale. Modifications morphologiques du compartiment postsynaptique chez les patients atteints de SLA

Figure 8 : Microscopie confocale. Spiculation du compartiment postsynaptique chez les patients atteints de SLA

Figure 9 : Reconstitutions 3D de compartiments postsynaptiques sans et avec spiculation

Figure 10 : Microscopie confocale. Exemples d'innervation des JNM chez les patients atteints de SLA

Figure 11: Représentation schématique de la terminaison de l'axone moteur et des différents types de bourgeonnement ("sprouting")

Figure 12 : Exemples des modifications morphologiques observées au niveau de la cellule de Schwann terminale en microscopie confocale

Figure 13 : Exemples de JNM partiellement ou totalement dénervée en microscopie électronique

Figure 14 : Microscopie électronique. Présence de RACH au niveau de la membrane musculaire synaptique en l'absence de plissement sous-neural. Empilements de lames basales Schwanniennes.

Figure 15 : Microscopie électronique. Interposition de la cellule de Schwann terminale dans la fente synaptique

VI. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux facteurs de risque exogènes et occupationnels évoqués dans la SLA

Tableau 2 : Principaux symptômes et signes cliniques de dysfonctionnement du MNC et du MNP

Tableau 3 : Principaux signes d'atteinte du MNC et du MNP dans les quatre régions du système nerveux (critères révisés d'El Escorial)

Tableau 4 : Critères révisés de l'El Escorial

Tableau 5 : Principales pathologies pouvant faire évoquer ou s'accompagner d'une atteinte motoneuronale

Tableau 6 : Principaux gènes identifiés dans la SLA

Tableau 7 : Principaux gènes associés avec la SLA sporadique

Tableau 8 : Caractéristiques cliniques des 11 patients

Tableau 9 : Caractéristiques cliniques et démographiques des 2 groupes de patients

Tableau 10 : Résultats de l'étude en SNR pour le nerf cubital et le nerf radial

Tableau 11 : Résultats de l'étude en SNR pour le nerf spinal et la face (couple V-XII)

Tableau 12 : Résultats de l'étude en SNR pour le nerf Sciatique Poplitée Externe

Tableau 13 : Quantification de la fragmentation du compartiment postsynaptique

Tableau 14 : Spiculation du compartiment postsynaptique

Tableau 15 : Classification de l'innervation des JNM pour chaque patient

Tableau 16 : Analyse quantitative globale de l'innervation des JNM

Tableau 17 : Caractéristiques de l'innervation des JNM pour l'ensemble des patients SLA

Tableau 18 : Caractéristiques morphologiques des cellules de Schwann terminales pour l'ensemble des patients SLA

Tableau 19 : Analyse morphométrique des fibres musculaires (biopsies de muscle deltoïde)

VII. LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Amorces utilisées pour l'analyse en RT-qPCR

VIII. INTRODUCTION

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), ou maladie de Charcot, est la plus fréquente des maladies du motoneurone de l'adulte. C'est une pathologie neurodégénérative affectant les motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière, du tronc cérébral et du cortex cérébral, responsable de paralysies extensives conduisant au décès dans des délais variables, le plus souvent entre 2 et 5 ans. La cause de la maladie n'est pas connue, même si l'implication de nombreux mécanismes physiopathologiques a été évoquée. Le seul traitement actuellement disponible est le riluzole, qui ne permet qu'un allongement modeste de la survie. Les données de la littérature sont en faveur d'altérations au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM), entre la partie terminale de l'axone moteur et le muscle, chez les patients atteints de SLA et dans plusieurs modèles murins de la maladie. Les résultats de plusieurs études morphologiques réalisées chez l'animal, suggèrent que l'atteinte de la JNM pourrait être très précoce et jouer un rôle clé dans la physiopathologie de la maladie, mais très peu de données sont disponibles chez les patients.

L'objectif premier de mon travail était donc de réaliser une caractérisation morphologique complète de la jonction neuromusculaire chez les patients atteints de SLA. Dans la deuxième partie de mon travail je me suis concentrée sur l'analyse de la capacité de réinnervation des patients et l'étude des mécanismes moléculaires impliqués.

IX. ETAT DE LA QUESTION

PREMIERE PARTIE : LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE

1. Rappels sur l'organisation de la motricité

1.1 Généralités

La hiérarchie fonctionnelle générale du mouvement est connue, dans ces grandes lignes, depuis les travaux de Sherrington au début du XX^{ème} siècle (Sherrington, 1906). Très schématiquement (Bossy, 1990), à la base du système, se situe la moelle épinière qui est le siège de l'activité motrice réflexe et joue un rôle dans le maintien de la posture et le tonus. Le cervelet, dont les voies transitent par la tronc cérébral, règle le déroulement du mouvement et en particulier la coordination spatio-temporelle. Au sommet du système se trouve le cerveau, l'étage thalamo-strié jouant un rôle majeur dans la motricité automatique et le cortex cérébral étant l'initiateur du mouvement volontaire. La motricité volontaire fait donc intervenir l'action coordonnée de nombreuses structures. Nous rappellerons très brièvement ici les différentes structures impliquées dans la propagation de l'influx nerveux du cortex moteur cérébral jusqu'au muscle effecteur, en excluant volontairement tous les aspects ayant trait à la planification, l'initiation et la programmation du mouvement. La voie motrice principale véhiculant la motricité volontaire est le faisceau cortico-spinal (Figure 1) qui naît du cortex moteur primaire. Les fibres du tractus cortico-spinal traversent successivement le centre ovale, la capsule interne, puis descendent dans le tronc cérébral et décussent pour 80% d'entre elles au niveau du bulbe (faisceau cortico-spinal croisé qui descend ensuite dans le cordon latéral de la moelle épinière). Les 20% restants constituent le faisceau cortico-spinal direct et descendent dans le cordon ventral de la moelle. Les axones contenus dans le faisceau cortico-spinal croisé se terminent en faisant synapse avec les motoneurones alpha de la corne antérieure de la moelle au niveau de chaque neuromère. Après avoir croisé la ligne médiane, les axones du faisceau cortico-spinal direct font également synapse avec les motoneurones de la corne antérieure de la moelle du côté opposé. Les axones issus des motoneurones quittent la moelle épinière par la racine ventrale des nerfs spinaux pour gagner le muscle effecteur via les troncs nerveux périphériques. Le tractus cortico-nucléaire, destiné aux motoneurones des nerfs crâniens, accompagne initialement le faisceau cortico-spinal pour se terminer controlatéralement sur les noyaux moteurs des nerfs crâniens dans le tronc cérébral.

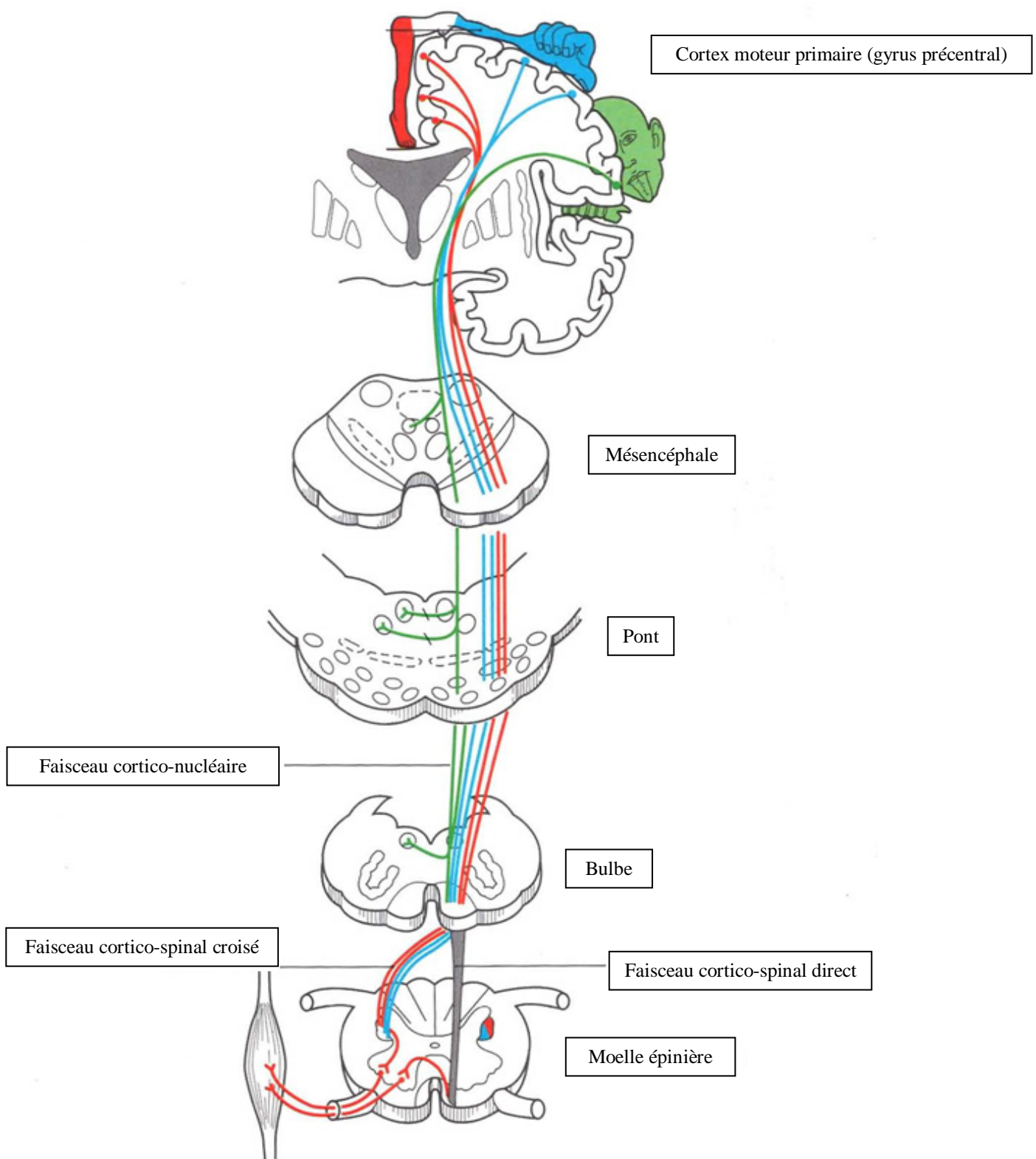


Figure 1: Trajet des voies pyramidales. Adapté de Vitte E. et Chevalier J.M., 1998.

1.2 Différents types de motoneurones

1.2.1 Cortex moteur primaire : cellules pyramidales de Betz

Les fibres du tractus cortico-spinal naissent des grandes cellules pyramidales de Betz, situées dans la couche 5 du cortex moteur primaire (aire 4 de Brodmann). Les cellules de Betz sont des motoneurones géants (jusqu'à 100 µm environ) qui diffèrent morphologiquement des autres cellules pyramidales, en particulier par la morphologie de leur arborisation dendritique (Rivara et al., 2003).

1.2.2 Moelle épinière

La corne antérieure de la moelle épinière (et les noyaux moteurs des nerfs crâniens) contiennent les corps cellulaires de 3 grands types de motoneurones (alpha, beta et gamma) innervant des cibles musculaires différentes (Manuel et Zytnicki, 2011).

Motoneurones alpha

Les motoneurones alpha, dont l'axone innerve les fibres musculaires squelettiques, sont de trois types différents en fonction du type de fibre musculaire qu'ils innervent. Les motoneurones innervant les fibres musculaires de type IIb/IIx (rapides et fatigables, glycolytiques) sont les plus larges (en terme de taille du soma et de diamètre axonal). Les motoneurones innervant les fibres musculaires de type I (lentes, oxydatives) sont les plus petits des motoneurones alpha. Les motoneurones alpha innervant les fibres musculaires de type IIa sont de taille intermédiaire.

Motoneurones gamma

Les motoneurones gamma innervent les fibres musculaires striées des fuseaux neuromusculaire (fibres musculaires intrafusales responsables de la régulation du tonus musculaire). Les motoneurones gamma sont les plus petits des motoneurones et sont de deux types différents : motoneurones gamma phasiques et gamma toniques.

Motoneurones beta

Les motoneurones beta innervent à la fois des fibres musculaires intrafusales et extrafusales. Ils sont de deux types : beta statiques (innervant la fibre intrafusale de type bag 2 et les fibres extrafusales de type IIa ou IIb) et beta dynamiques (innervant la fibre intrafusale de type bag 1 et les fibres extrafusales de type I).

1.3 L'unité motrice

L'effecteur final ("la voie finale commune") de toute action motrice est constitué par l'unité motrice (UM), définie en 1925 par Sherrington et Liddell comme étant l'ensemble du motoneurone alpha, de son axone et des fibres musculaires qu'il innerve (Sherrington et Liddell, 1925). La taille d'une UM est variable en fonction de la précision du mouvement lié au muscle concerné : de quelques fibres musculaires pour des mouvements précis (muscles de la main, muscles oculomoteurs) à plusieurs centaines de fibres pour des mouvements relativement moins précis mais puissants (biceps brachial ou quadriceps par exemple). On distingue donc 3 types d'UM en fonction du type de motoneurone et du type de fibres musculaires qu'il innerve :

- Les UM de type "Lent" (ou "Slow", S). Elles correspondent aux motoneurones de type S émettant un axone de petit diamètre, à conduction lente, et à fréquence de décharge relativement basse, innervant les fibres musculaires de type 1;
- Les UM de type "Rapide-Fatigable" (ou "Fast-Fatigable", FF), correspondant aux motoneurones FF à fréquence de décharge haute, émettant un axone de large diamètre et dont la vitesse de conduction est la plus élevée, innervant les fibres musculaires de type IIb;
- Les UM de type "Rapide-Résistante à la fatigue" (ou Fast-Fatigue resistant", FR), correspondant aux motoneurones FR à haute fréquence de décharge, innervant les fibres musculaires de type IIa.

Les expériences d'innervation croisée, réalisées pour la première fois chez le chat par John Eccles et collaborateurs (Buller et al., 1960) ont montré que les caractéristiques contractiles des fibres musculaires étaient sous la dépendance des propriétés du motoneurone innervant l'UM correspondante, et en particulier de sa fréquence de décharge.

2. La jonction neuromusculaire squelettique

La plaque motrice ou JNM est le site au niveau duquel l'influx nerveux arrive au niveau du muscle squelettique et provoque sa contraction (Figure 2). La JNM est constituée de 3 éléments principaux : la terminaison nerveuse du motoneurone alpha, la petite zone de membrane musculaire qui lui fait face et la cellule de Schwann terminale (Couteaux, 1973).

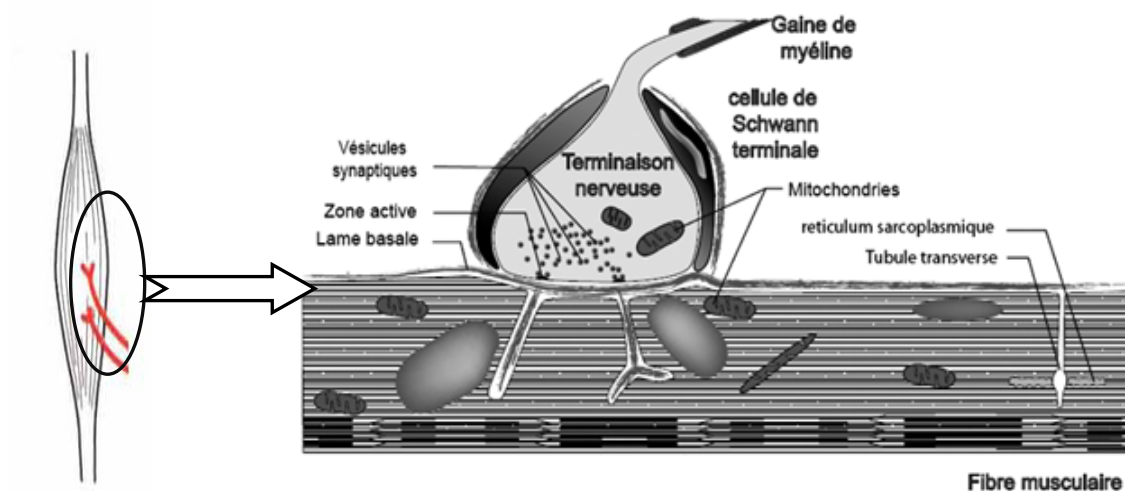


Figure 2: Organisation topographique de la jonction neuromusculaire.

2.1 Les différents éléments de la jonction neuromusculaire

2.1.1 La terminaison nerveuse du motoneurone alpha

L'extrémité de l'axone du motoneurone alpha constitue la terminaison nerveuse motrice (ou bouton synaptique), spécialisée dans la libération du neurotransmetteur, l'acétylcholine (ACh). Elle comporte un grand nombre de vésicules synaptiques d'environ 50 nm de diamètre contenant chacune entre 5000 et 10000 molécules d'ACh. Le cytoplasme de la terminaison nerveuse motrice contient également de nombreuses mitochondries, fournissant l'énergie nécessaire à la synthèse et la libération du neurotransmetteur. Des vésicules synaptiques sont concentrées au niveau de "zones actives", correspondant à des épaissements de la membrane nerveuse (ou membrane présynaptique) où se produisent les phénomènes de fusion-exocytose des vésicules synaptiques permettant la libération de leur contenu dans la fente synaptique (Couteaux et Pecot-Dechavassine, 1974). Les zones actives sont également associées à un grand nombre de canaux calciques et potassiques voltages-dépendants, permettant d'optimiser la libération d'ACh, qui se fait sous la dépendance du calcium (Sanes et Lichtman, 1999).

2.1.2 La fibre musculaire squelettique

En regard de la terminaison nerveuse se situe la plaque motrice de la fibre musculaire. A ce niveau, la membrane de la fibre musculaire (ou membrane postsynaptique) présente une

dépression située en regard de la terminaison nerveuse : la gouttière synaptique. Elle est spécialisée pour répondre de façon rapide à la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique et générer une dépolarisation de la plaque motrice puis un potentiel d'action musculaire. Elle se caractérise morphologiquement par la présence d'invaginations d'environ 1 μm de profondeur ou plis sous-neuraux, bien visibles en microscopie électronique (Figure 3). La membrane postsynaptique présente une concentration très élevée ($>10000/\mu\text{m}^2$) en récepteurs nicotiniques à l'ACh (RACH), alors qu'elle n'est que de $10/\mu\text{m}^2$ au niveau extrasynaptique (Salpeter et Loring, 1985). Les RACH sont des récepteurs canaux transmembranaires perméables aux cations lors de la liaison de l'ACh sur ses sites de fixation. Chez l'adulte, il s'agit à l'état normal des RACH de type "epsilon" formés des sous-unités α_1 , β_1 , δ et ϵ . Ils sont concentrés au niveau des sommets et de la partie latérale haute des plis sous-neuraux alors que les canaux sodiques voltages-dépendants, nécessaires à la génération du potentiel de plaque motrice, sont eux concentrés dans le fond des plis (Sanes et Lichtman, 1999). Un appareil cytosquelettique complexe est associé aux segments intra-cytoplasmiques des RACH, assurant le maintien du plissement membranaire et d'une forte densité en RACH. La composition moléculaire du cytosquelette des plis est également hétérogène. Au sommet des plis, rapsyne, utrophine et α -dystrobrevine-1 colocalisent avec les RACH. Ankyrine, dystrophine et α -dystrobrevine-2 sont concentrées au fond des plis (Sanes et Lichtman, 1999).

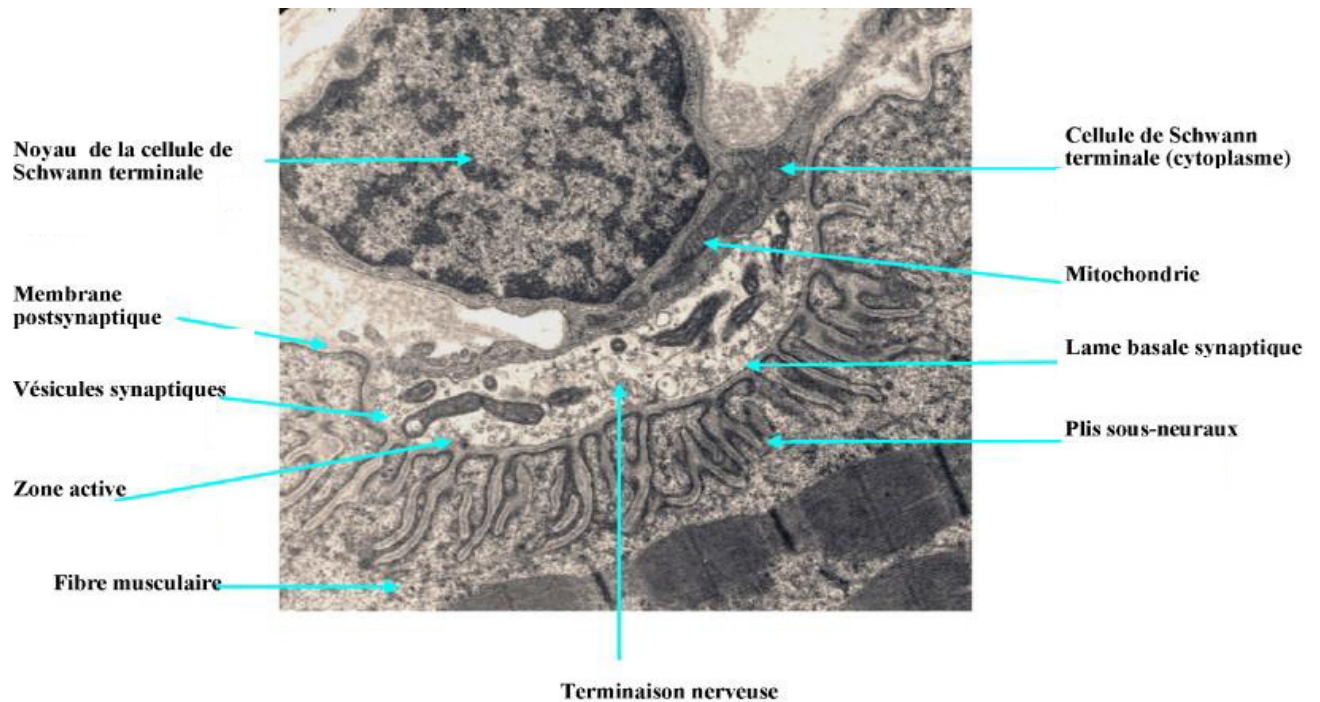


Figure 3: Jonction neuromusculaire humaine adulte observée en microscopie électronique. Micrographie de J.P Leroy

2.1.3 La cellule de Schwann

Il existe deux types de cellules de Schwann dérivant des mêmes progéniteurs mais de structure et de fonction différentes : la cellule de Schwann myélinisante, en contact avec les portions préterminales de l'axone et formant la gaine de myéline; et la cellule de Schwann terminale, non myélinisante. La cellule de Schwann terminale coiffe la terminaison nerveuse et joue un rôle important dans la formation, la maintenance et la régénération des JNM. Elle libère ainsi de nombreux facteurs trophiques comme le NGF (facteur de croissance du nerf) ou le CNTF (facteur neurotrophique ciliaire) (Terenghi, 1999). La cellule de Schwann terminale joue vraisemblablement également un rôle de modulation de l'efficacité de la transmission synaptique par le biais de variations de sa concentration en calcium intracytoplasmique (Castonguay et al., 2001; Castonguay et Robitaille, 2001).

2.1.4 La lame basale synaptique

La fente synaptique, qui sépare la terminaison nerveuse de la membrane postsynaptique, contient un réseau dense aux électrons constitué de glycoprotéines et de protéoglycanes : la lame basale synaptique, qui s'insinue jusque dans les plis sous-neuraux. La lame basale synaptique diffère partiellement de la lame basale extra-synaptique (recouvrant l'ensemble de la fibre musculaire squelettique en dehors de la zone jonctionnelle) par sa composition. En plus des molécules communes à toutes les lames basales (collagène de type IV, entactine, fibronectine, perlecan, laminines $\alpha 2$ et $\gamma 1$), elle contient en particulier les formes asymétriques des enzymes de dégradation de l'ACh : acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE). Elle renferme également des isoformes spécifiques de la laminine contenant la sous-unité $\beta 2$ et des facteurs sécrétés par le motoneurone comme l'agrine et la neuréguline (Massoulie et Millard, 2009).

2.2 La transmission synaptique au niveau de la jonction neuromusculaire

La jonction neuromusculaire est à la base de la découverte du principe de synapse chimique. La première démonstration de la transmission synaptique chimique, cholinergique, est faite par Dale en 1936 (Dale et al., 1936). Dans les années 50, Del Castillo et Katz mettront ensuite en évidence le caractère quantique et vésiculaire de la libération du neurotransmetteur (Del Castillo et Katz, 1954). Katz et Miledi montreront par la suite que le potentiel d'action présynaptique augmente la libération du neurotransmetteur par une augmentation transitoire de la perméabilité de la membrane présynaptique aux ions calcium (Katz et Miledi, 1965).

2.2.1 Séquence des phénomènes durant la transmission neuromusculaire

L'arrivée de l'influx nerveux au niveau de la terminaison axonale du motoneurone entraîne l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et l'entrée d'ions Ca^{2+} . L'augmentation de la concentration en calcium dans la terminaison nerveuse déclenche une augmentation marquée de l'exocytose des vésicules synaptiques. Le délai synaptique, correspondant à la fusion-exocytose des vésicules synaptiques est d'environ 0,75s. L'ACh diffuse ensuite très rapidement jusqu'aux RACH au niveau des plis jonctionnels de la membrane postsynaptique. La liaison de l'ACh sur ses sites de fixation entraîne une augmentation de la conductance aux cations et un flux sodique entrant responsable d'une dépolarisation localisée de la membrane de la plaque motrice : le potentiel de plaque motrice (ppm). L'amplitude du ppm est

conditionnée par la quantité d'ACh libérée. Chez le sujet sain, elle est très supérieure au seuil de déclenchement du potentiel d'action musculaire. Le ppm va engendrer à son tour un potentiel d'action musculaire qui, en se propageant dans les deux sens le long de la fibre musculaire, va permettre la contraction de la fibre musculaire. La différence entre l'amplitude du ppm et l'amplitude nécessaire à l'apparition d'un potentiel d'action musculaire constitue la marge de sécurité de la transmission synaptique.

2.2.2 Potentiel de plaque motrice miniature

Les potentiels de plaque motrice miniatures (ppmm) sont enregistrés au niveau de la JNM en l'absence de toute stimulation, donc de tout influx nerveux le long de l'axone moteur. Ils correspondent à la libération spontanée de quanta d'ACh par la membrane de la terminaison nerveuse, un quantum correspondant au contenu en ACh d'une seule vésicule synaptique.

2.2.3 Potentiel de plaque motrice (ou potentiel postsynaptique excitateur)

Le ppm correspond à la libération de quanta d'ACh provoquée par l'influx nerveux. Son amplitude est donc toujours un multiple du ppmm. Lorsqu'un influx nerveux arrive à la terminaison nerveuse, il entraîne une augmentation marquée du nombre de quanta d'ACh libérés permettant au ppm produit de dépasser le seuil d'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants de la membrane de la fibre musculaire. L'entrée massive d'ions sodium dans la fibre musculaire est alors responsable de la genèse du potentiel d'action musculaire.

2.3 Formation de la jonction neuromusculaire

Les trois types cellulaires nécessaires à la formation de la JNM migrent sur de longues distances avant d'arriver au lieu de la synapse (Sanes et Lichtman, 1999). Les fibres musculaires dérivent de cellules mésodermiques ayant acquis leur identité myogénique dans le dermatomyotome des somites, qui vont migrer jusqu'aux zones de formation des muscles. Ces progéniteurs myogéniques vont alors se diviser puis se différencier en myoblastes. Puis, la fusion des myoblastes en myotubes s'accompagne de l'initiation de la transcription des gènes codant pour les différentes sous-unités des RACH. Les motoneurones dérivent de progéniteurs multipotents de la portion ventrale du tube neural, et les cellules de Schwann de la crête neurale. Entre le 13^{ème} et le 14^{ème} jour du développement embryonnaire chez la souris, le cône de croissance du motoneurone contacte un myotube. Dans les minutes qui suivent l'établissement de ce contact, la transmission neuromusculaire apparaît (Evers et al.,

1989; Xie et Poo, 1986) mais de façon très peu efficace du fait de l'absence de spécialisation, à ce stade du développement, des compartiments pré- et postsynaptiques.

2.3.1 La différenciation présynaptique

Le cône de croissance du motoneurone est capable de libérer le neurotransmetteur en réponse à une stimulation électrique, avant tout contact avec le muscle. Pendant l'étape suivante l'arborisation terminale du cône de croissance va maturer avec le développement d'une zone présynaptique active : accumulation de vésicules synaptiques, élargissement de la fente synaptique et apparition de la lame basale, puis apparition des zones actives (Sanes et Lichtman, 1999). La spécialisation présynaptique ne se forme qu'au site de contact avec le muscle, sous la dépendance de facteurs synthétisés par le muscle cible (Figure 4), dont les facteurs de croissance fibroblastiques FGF7, 10 et 22, la laminine $\beta 2$ et le collagène $\alpha 3/6$ (IV), spécifique des lames basales (Fox et al., 2007).

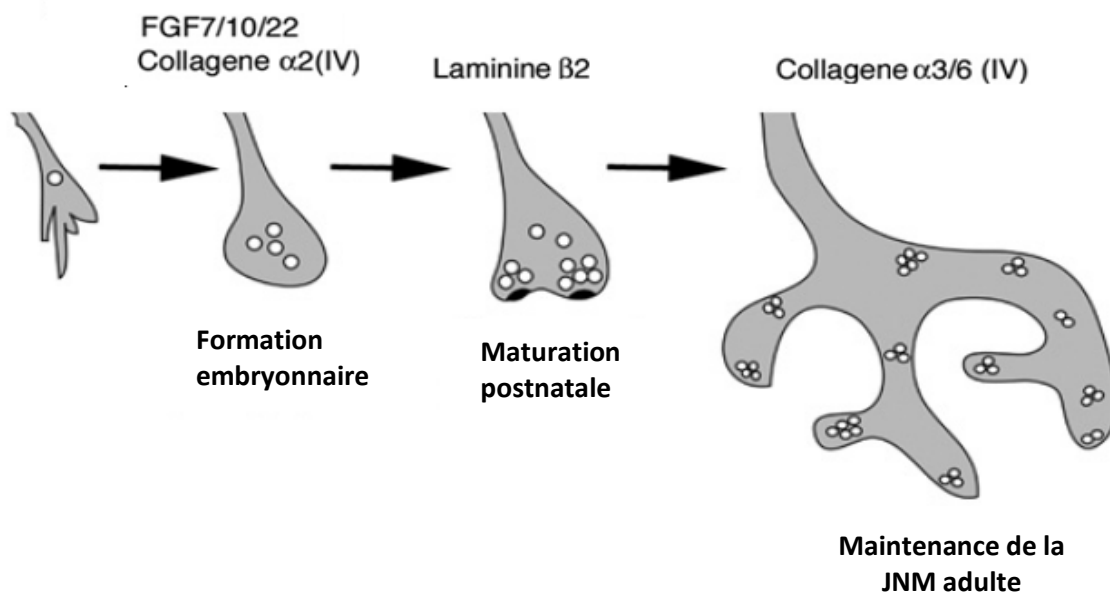


Figure 4: Modèle d'organisation séquentielle de la spécialisation présynaptique.
Adapté de Fox et al., 2007.

2.3.2 La différenciation postsynaptique

Le motoneurone produit deux signaux locaux entraînant la différenciation de la membrane postsynaptique en regard : la neuréguline qui stimule la transcription des noyaux sous-synaptiques, et l'agrine. Les RACH de type "gamma" (formés des sous-unités α_1 , β_1 , δ et γ) sont présents en faible quantité dans les myoblastes. Ils sont up-régulés au cours de la fusion en myotubes pour atteindre une densité de $1000/\mu\text{m}^2$ chez le rongeur (Kummer et al., 2006), avec une répartition initialement uniforme tout le long de la fibre musculaire. Chez l'adulte, les RACH seront concentrés au niveau de la région synaptique de la membrane musculaire ($>10000/\mu\text{m}^2$ alors qu'elle n'est que de $10/\mu\text{m}^2$ au niveau extrasynaptique) (Salpeter et Loring, 1985). L'agrégation des RACH, indispensable à la différenciation postsynaptique, est sous le contrôle de plusieurs signaux, dont la voie Agrine-MuSK.

Voie de signalisation Agrine/MuSK

Une voie majeure conduisant à la différenciation postsynaptique implique une protéine de type héparane-sulfate protéoglycane concentrée dans la lame basale synaptique : l'agrine (Ruegg et Bixby, 1998). L'agrine présente plusieurs isoformes différant selon leur lieu de synthèse, leur structure et leur capacité d'agrégation des RACH (Bezakova et Ruegg, 2003). L'agrine libérée par le motoneurone (agrine neuronale) possède ainsi une capacité d'agrégation mille fois plus importante que celle de l'agrine sécrétée par les myotubes ou par la cellule de Schwann (Gesemann et al., 1995). La voie de signalisation de l'agrine implique MuSK (Muscle Specific Kinase), un récepteur à activité tyrosine kinase, spécifiquement exprimé dans le muscle au niveau de la membrane postsynaptique. L'agrine entraîne la phosphorylation et l'activation de la propriété kinase de MuSK, en présence de la protéine Dok-7 (*Downstream of kinase-7*). Une fois phosphorylé, MuSK active une voie de signalisation conduisant à la synthèse par les noyaux sous-synaptiques des RACH et à leur agrégation, ainsi qu'à la différenciation synaptique. L'agrine ne se lie pas directement à MusK. Le partenaire de MusK, assurant à la fois la liaison avec l'agrine et l'activation de MusK n'a été identifié que récemment (Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008). Il s'agit d'un membre de la famille des récepteurs des LDL (*low density lipoprotein*) : Lrp4 (*low-density lipoprotein receptor-related protein4*). MusK et Lrp4 forment un complexe même en l'absence de l'agrine, la liaison de cette dernière venant renforcer cette interaction.

Pré-empreinte ou "pre-patterning" : agrégats aneuxaux de récepteurs à l'acétylcholine

L'agrégation des RACH est cependant possible en l'absence d'agrine (Lin et al., 2001). Des agrégats de RACH peuvent également se former, et même se regrouper en une bande centrale dans le muscle, en l'absence d'innervation motrice (Yang et al., 2000; Yang et al., 2001). Dans les années 70, la formation spontanée d'agrégats de RACH sur des myotubes cultivés en l'absence de neurones moteurs avait déjà été démontrée ("hot-spots") (Fischbach et Cohen, 1973; Vogel et al., 1972). In vitro, ces "hot-spots" sont dispersés à l'arrivée de l'innervation, la terminaison nerveuse induisant la formation de ses propres sites d'agrégation des RACH (Anderson et Cohen, 1977; Frank et Fischbach, 1979). In vivo, des travaux récents chez le poisson-zèbre ont montré que certains de ces agrégats pouvaient en fait être reconnus et incorporés au niveau des futures JNM (Flanagan-Steet et al., 2005). Une des fonctions primaires de l'agrine semble en fait de contrecarrer le signal local de dispersion des agrégats préformés de RACH, signal provoqué par l'arrivée de l'innervation et la libération d'ACh (Misgeld et al., 2005).

2.4 Maturation et maintenance de la jonction neuromusculaire

Si la transmission neuromusculaire est fonctionnelle avant la naissance, la maturation des JNM se poursuit après la naissance (chez la souris) (Sanes et Lichtman, 1999; Shi et al., 2012). Durant la vie embryonnaire, la plupart des fibres musculaires sont innervées par plusieurs axones moteurs. Cette polyinnervation va disparaître dans les premières semaines de vie post-natale. La plaque motrice, de forme ovale et bien délimitée à la naissance, va se perforer et acquérir sa configuration finale de type "bretzel". Dans les deux semaines qui suivent la naissance, la gouttière synaptique et les plis sous neuraux de la membrane musculaire vont également se former. De nombreuses modifications moléculaires se produisent également. En particulier la sous-unité γ des RACH - spécifique de l'embryon - est remplacée précocement par la sous-unité ϵ , entraînant une augmentation de la conductance du calcium du récepteur.

DEUXIEME PARTIE : LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE

Décrite par Jean Martin Charcot en 1869 (Charcot et Joffroy, 1869), la SLA est une affection neurodégénérative progressive touchant les motoneurones du cortex cérébral (motoneurone central, MNC), du bulbe et de la moelle épinière (motoneurone périphérique, MNP) (Ince et al., 1998).

1. Données épidémiologiques

1.1 Incidence

La SLA est une pathologie relativement rare dont l'incidence est évaluée, selon les études, entre 0,4 et 2,6 pour 100 000 habitants par an (Beghi et al., 2006). L'incidence de la maladie augmente régulièrement à partir de l'âge de 40 ans avec, dans la majorité des études de population, un pic d'incidence dans la tranche d'âge 65-75 ans (Logroscino et al., 2008). Le ratio homme:femme est proche de 1,5/1 dans les études les plus récentes (Soriani et Desnuelle, 2009). Une étude prospective récente basée sur l'analyse de 6 registres-sources dans 3 pays Européens différents (Irlande, Royaume Uni, Italie) a ainsi évalué l'incidence de la SLA en Europe à 2,1 cas pour 100 000 habitants par an. L'incidence annuelle de la maladie était plus élevée chez les hommes, avec un ratio homme:femme = 1,4 après ajustement sur la structure de la population Européenne (Logroscino et al., 2010).

1.2 Clusters géographiques : l'exemple des indiens Chamorro de l'Ile de Guam

Dans certaines régions du globe, des foyers à haute incidence ont été décrits, notamment dans le Pacifique Ouest (Population Chamorro de l'Ile de Guam, péninsule Kii au Japon, régions Ouest de Nouvelle Guinée), où l'incidence de la SLA était plus de 50 fois supérieure à celle observée sur le reste du globe au début des années 50 (Kurland et Mulder, 1954a; Kurland et Mulder, 1954b). Cliniquement, l'atteinte motoneuronale s'associait souvent à des signes extrapyramidaux ou démentiels (forme SLA-parkinsonisme-démence) (Brody et al., 1975). Les aspects neuropathologiques observés dans la forme de l'Ile de Guam différaient de ceux retrouvés dans la SLA avec en particulier la présence de dégénérescences neurofibrillaires réactives pour la protéine Tau au niveau des neurones moteurs, l'apparentant aux taupathies (Umahara et al., 1994).

L'existence de ces zones géographiques à très haute incidence a suscité de nombreuses recherches, et de multiples hypothèses étiologiques ont été proposées, en particulier

génétiques ou environnementales (infectieuses, toxiques...). Sur l'île de Guam, le rôle toxique du β -methyলামinoalanine (BMAA), contenu dans les graines de cycas utilisées pour préparer de la farine par les Indiens Chamorro est fortement suspecté (Spencer et al., 1986). Il a ainsi été démontré récemment que le BMAA est un puissant agoniste des récepteurs du glutamate, principal neuromédiateur de l'excitotoxicité (Rao et al., 2006). Le BMAA est synthétisé par des cyanobactéries saprophytes se développant au niveau des racines du cycas puis, via sa remontée par la sève, se retrouve concentré dans les graines (Murch et al., 2004). Présent en faible concentration dans la farine, le BMAA pourrait tout de même avoir été toxique via la consommation de chauves-souris, se nourrissant elles-mêmes de graines de cycas. Argument en faveur de cette hypothèse, la modification des habitudes alimentaires dans la population Chamorro s'est accompagnée d'une réduction parallèle de l'incidence de la maladie sur l'île de Guam (Spencer et al., 2005).

1.3 Vétérans de la guerre du Golfe

Deux études ont rapporté une incidence plus élevée que la moyenne dans la population de militaires de retour de la guerre du Golfe (1990-1991) (Haley, 2003; Horner et al., 2003). Une augmentation du nombre de cas diagnostiqués chez les vétérans âgés de moins de 45 ans a ainsi été rapportée (Haley, 2003). Cette augmentation de l'incidence s'est limitée à la décennie qui a suivi la guerre du Golfe, faisant évoquer une exposition environnementale. L'exposition à des composés organophosphorés ou aux agents chimiques neurotoxiques (comme le gaz sarin) a ainsi été évoquée (Haley, 2003). Plus récemment, le rôle potentiel de l'inhalation de cyanobactéries ou de cyanotoxines comme le BMAA, contenues dans la poussière présente localement, a été suggéré (Cox et al., 2009).

1.4 Facteurs de risque

Les principaux facteurs de risque reconnus à ce jour, dans les formes sporadiques, sont l'âge et le sexe masculin (Logroscino et al., 2010). L'existence au sein de la famille du patient d'une mutation reconnue comme causale, avec transmission mendélienne, est aussi un facteur de risque. La mise en évidence d'agrégats spatio-temporels de la SLA, comme ceux observés dans le Pacifique Ouest, a soulevé de nombreuses interrogations sur la possibilité de facteurs de risque environnementaux. De très nombreux facteurs de risque ont ainsi été évoqués (Tableau 1) mais aucune association n'a, à ce jour, été démontrée de façon convaincante et reproductible et les résultats des différentes études épidémiologiques sont contradictoires.

Tableau 1: Principaux facteurs de risque exogènes et occupationnels évoqués dans la SLA. Sources: Gil et al., 2007.

<i>Facteurs de risque exogènes</i>
Exposition aux métaux lourds Plomb Mercure Cuivre Sélénium Aluminium Cadmium
Exposition aux pesticides/herbicides
Expositions aux solvants
Facteurs traumatiques
Electrocution
<i>Facteurs de risque occupationnels / mode de vie</i>
Travail agricole
Activité physique
Football professionnel
Activités militaires Guerre du Golfe Hors contexte de la guerre du Golfe
Tabagisme
Consommation d'alcool
Habitudes alimentaires Régimes pauvres en fibres Consommation de Glutamate Régime pauvre en vitamine E et acides gras polyinsaturés

2. Neuropathologie

2.1 La perte en motoneurones : un marqueur histopathologique essentiel

Sur le plan neuropathologique (Ince, 2000), la SLA se caractérise en premier lieu par une diminution du nombre et de la taille des neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle et des noyaux moteurs du bulbe (noyau de l'hypoglosse, noyau ambigu). Cette dépopulation neuronale s'associe à une gliose astrocytaire et une réaction microgliale. Cette atteinte touche préférentiellement les motoneurones alpha et à moindre degré les motoneurones gamma. Elle respecte classiquement le noyau d'Onuf, situé dans la moelle sacrée (innervant les muscles périnéaux), et les noyaux des nerfs oculomoteurs. Toutefois, dans les formes très évoluées de SLA (notamment chez des patients ayant vécu de longues années grâce à une ventilation assistée), ces différents groupes de motoneurones sont également atteints. Un aspect de pâleur de la myéline des cordons latéraux de la moelle touchant préférentiellement la voie cortico-spinale est également observé, qui refléterait la démyélinisation axonale de la voie pyramidale liée à l'atteinte des motoneurones corticaux. L'intensité de la dégénérescence du tractus corticospinal varie selon l'étage étudié, avec un gradient caudo-cranial supportant l'hypothèse d'un phénomène de dégénérescence de type "dying-back" (Kato, 2008). Elle est plus marquée au niveau de la moelle et des pyramides bulbaires, mais plus inconstante et plus modérée au niveau de la protubérance et des pédoncules. L'atteinte de la capsule interne est plus rarement observée (Le Bigot, 1972).

L'atteinte structurelle des motoneurones corticaux (ou grandes cellules pyramidales de Betz, localisés principalement dans la couche 5 du cortex) semble quantitativement moins importante, le nombre des cellules pyramidales étant peu diminué, y compris dans les formes évoluées de la maladie. Ceci souligne le rôle probable d'une atteinte plus fonctionnelle que structurelle des cellules corticales dans la SLA, ce que semblent confirmer différentes études en Spectroscopie par Résonance Magnétique et en Tomographie à Emission de Positons (Eisen et Weber, 2001). Cette atteinte des motoneurones corticaux est associée à une astrocytose et une microgliose diffuse.

2.2 Une pathologie "multisystémique"

La dégénérescence des cordons latéraux de la moelle semble pouvoir s'étendre au delà de la seule voie cortico-spinale et toucher d'autres voies descendantes prenant leur origine dans le tronc cérébral (Chou, 1997), notamment les faisceaux rubrospinaux, vestibulospinaux et

tectospinaux, mais aussi des voies ascendantes comme les faisceaux spinothalamiques, et à moindre degré les faisceaux spinocérébelleux (Le Bigot, 1972). De surcroît, l'atteinte d'autres systèmes non-moteurs est fréquemment observée. Ainsi, une pâleur des cordons postérieurs est souvent rapportée (Ince, 2000). Enfin l'atteinte d'autres groupes neuronaux que ceux de la corne antérieure de la moelle, des noyaux moteurs du bulbe et du cortex cérébral est possible. Une dépopulation neuronale peut ainsi se voir dans le thalamus, les noyaux gris centraux notamment au niveau des neurones dopaminergiques de la substance noire (en l'absence de corps de Lewy), et la réticulée bulbo-pontique (Burrow et Blumbergs, 1992; Kato et al., 1993).

2.3 Corps d'inclusion intraneuronaux

Le diagnostic de SLA est appuyé par la présence de plusieurs types d'inclusions cytoplasmiques. De nombreux corps d'inclusion intraneuronaux ont ainsi été décrits dans la SLA, dont les plus caractéristiques sont les inclusions immunoréactives pour l'ubiquitine (Leigh et al., 1988).

2.3.1 Inclusions positives pour l'ubiquitine : un marqueur neuropathologique de la SLA

L'ubiquitine est une protéine de faible poids moléculaire jouant un rôle central dans la dégradation non lysosomale des protéines (système ubiquitine-protéasome). Des inclusions immunoréactives pour l'ubiquitine sont retrouvées dans les formes sporadiques et les formes familiales de SLA (Leigh et al., 1991). Ces inclusions sont visibles dans le cytoplasme des motoneurones de la corne antérieure de la moelle et des noyaux moteurs de nerfs crâniens, et occasionnellement des motoneurones du cortex (Leigh et al., 1991). Elles sont aussi retrouvées, de façon inconstante, au niveau des neurones du cortex frontotemporal et de l'hippocampe (Ince et al., 1998; Ince, 2000), et plus exceptionnellement du striatum (Kawashima et al., 1998). Tout un continuum d'inclusions ont été décrites depuis les inclusions en écheveau ("skein-like") jusqu'aux inclusions denses et hyalines ("round hyaline inclusions"). Ces dernières peuvent prendre un aspect évoquant des corps de Lewy (« Lewy body-like ») même si, contrairement aux corps de Lewy observés dans la Maladie de Parkinson, elles sont négatives pour l'alpha-synucléine (Kato et al., 1989). Ces inclusions hyalines de type "corps de Lewy" sont retrouvées dans les formes de SLA associées à une mutation sur le gène de la Superoxyde dismutase 1 (SOD1) et sont alors immunoréactives pour la protéine SOD1 (Kato, 2008). Les inclusions en "écheveau" immunoréactives pour

l'ubiquitine sont également immunoréactives pour la protéine p62 et sont considérées comme caractéristiques de la SLA classique. Ces inclusions ubiquitine-positives ne présentent pas d'immunoréactivité pour la protéine Tau, ni généralement pour les différents épitopes des protéines neurofilamentaires (Mather et al., 1993; Migheli et al., 1994).

2.3.2 Corps de Bunina

Les corps de Bunina sont de petits corps éosinophiles granulaires (1-3µm de diamètre) qui sont retrouvés au niveau du cytoplasme et des dendrites des motoneurones de la corne antérieure. Ils sont considérés comme un marqueur histopathologique de la maladie, même s'ils sont moins fréquents (30-50% des cas environ) que les inclusions ubiquitinées (Ince, 2000; Okamoto et al., 2008). Ces inclusions ont été décrites dans la SLA sporadique et dans les formes de SLA familiale non liées à la présence d'une mutation sur le gène SOD1 (Kato, 2008). Les marquages immunohistochimiques ont permis d'y mettre en évidence la présence de 3 protéines : cystatine C (Okamoto et al., 1993), transferrine (Mizuno et al., 2006) et plus récemment périphérine (Mizuno et al., 2011).

2.3.3 Anomalies neurofilamentaires

L'accumulation de neurofilaments est fréquemment observées, surtout à la partie proximale des axones ("axonal swelling", sphéroïdes axonaux) (Ince, 2000). Ces sphéroïdes axonaux sont immunoréactifs pour les épitopes des protéines neurofilamentaires et aussi la périphérine (Migheli et al., 1993). Des inclusions neurofilamentaires ("conglomérats hyalins") ont été également rapportées dans les formes familiales liées à la présence d'une mutation SOD1 (Kato, 2008). Il s'agit de larges agrégats (10-15 nm de diamètre) constitués de neurofilaments et d'autres protéines cytoplasmiques ou organelles. Elles sont également réactives pour les épitopes des protéines neurofilamentaires.

2.3.4 Composants protéiques des inclusions : un lien entre génétique et neuropathologie

Plusieurs protéines codées par des gènes mutés dans certaines formes familiales de SLA sont des composants importants des inclusions immunoréactives pour l'ubiquitine (Al-Chalabi et al., 2012). C'est le cas en particulier des protéines SOD1, TAR DNA-binding protein 43 (TDP43) et Fused in Sarcoma (FUS).

Inclusions immunoréactives pour SOD1 :

Les patients SLA porteurs d'une mutation SOD1 présentent des inclusions neuronales et astrocytaires immunoréactives pour la protéine SOD1 et l'ubiquitine. Il s'agit des inclusions hyalines "Lewy body-like" dans les motoneurones et inclusions hyalines astrocytaires (Kato, 2008).

Inclusions immunoréactives pour TDP43 :

TDP43 a été identifiée en 2006 comme étant un composant protéique principal des inclusions immunoréactives pour l'ubiquitine chez les patients atteints de SLA et dans les formes de démence fronto-temporale (DFT) avec inclusions ubiquitine-positives (Neumann et al., 2006). Ces inclusions positives pour TDP43 ont été décrites à la fois dans les formes sporadiques de SLA et dans les formes familiales non liées à une mutation SOD1 (Mackenzie et al., 2007). La localisation anormale de la protéine TDP43 dans le cytoplasme des motoneurones est maintenant considérée comme un trait neuropathologique clé de la SLA (Shan et al., 2009). La forme pathologique de TDP43 est hyperphosphorylée (Kwong et al., 2007) mais ne semble pas être la cible principale de l'ubiquitination (Sanelli et al., 2007). Les inclusions cytoplasmiques immunoréactives pour TDP43 sont généralement absentes dans les formes familiales de SLA en rapport avec une mutation SOD1 (Mackenzie et al., 2007; Tan et al., 2007; Maekawa et al., 2009) sauf dans de rares cas rapportés (Robertson et al., 2007; Okamoto et al., 2011). La présence d'inclusions TDP43 positives a par contre été rapportée chez des patients porteurs d'une mutation TARDBP, FUS (Deng et al., 2010) ou C9ORF72 (Al-Chalabi et al., 2012).

Inclusions immunoréactives pour FUS :

Des inclusions immunoréactives pour FUS, qui colocalisent avec TDP43 et l'ubiquitine, ont été décrites dans les formes sporadiques de SLA, de SLA-DFT et dans les formes familiales liées à une mutation sur le gène FUS (Deng et al., 2010). Leur présence chez les patients porteurs d'une mutation TARDBP a été rapportée (Deng et al., 2010) mais semble inconstante (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009).

2.3.5 SLA avec démence fronto-temporale associée

Dans les formes SLA-DFT, outre les lésions classiques de SLA, on observe de façon aspécifique une atrophie corticale diffuse à prédominance frontotemporale (Kew et Leigh,

1992), associée à une microvacuolisation de la couche 2 du cortex dans les zones les plus atteintes (Lowe, 1994), et fréquemment à une gliose de la substance blanche sous-corticale des régions frontotemporales. Une dégénérescence de la substance noire (en l'absence de corps de Lewy) est aussi habituelle. Le signe neuropathologique le plus spécifique est la présence d'inclusions immunoréactives pour l'ubiquitine identiques à celles observées dans le péricaryon des motoneurones, mais avec une répartition plus diffuse que dans une SLA typique (Ince, 2000). Ces inclusions ubiquitine-positives sont retrouvées de façon caractéristique au niveau des cellules granulaires dentelées de l'hippocampe et, de façon plus variable, au niveau des couches 2 et 3 du cortex des régions frontotemporales (Ince, 2000). TDP43 en est également le composant protéique principal (Mackenzie et al., 2007).

3. Données Cliniques

3.1 Présentation clinique habituelle

Cliniquement, la SLA se traduit par l'association de signes et de symptômes témoignant de l'atteinte du MNC et du MNP, touchant progressivement les 4 territoires anatomiques : bulbaire, cervical (membres supérieurs et respiration), lombaire (membres inférieurs) et thoracique (Swash, 2000). L'atteinte du MNC (Tableau 2) se traduit par une parésie motrice sans amyotrophie et un ralentissement des mouvements fins. A l'examen clinique, on peut objectiver une contracture pyramidale (spasticité) avec accentuation des réflexes ostéo-tendineux, une fréquente inversion uni- ou bilatérale du réflexe cutané plantaire (signe de Babinski), un signe de Hoffman, et une labilité émotionnelle (affect "pseudo-bulbaire"). L'atteinte du MNP entraîne fatigabilité musculaire, crampes et fasciculations, avec à l'examen clinique, atrophie musculaire, hypotonie et abolition des réflexes ostéo-tendineux. Elle est confirmée par des arguments électrophysiologiques.

Tableau 2: Principaux symptômes et signes cliniques de dysfonctionnement du MNC et du MNP. Source: Swash, 2000

Dysfonctionnement du MNC

Symptômes

Faiblesse musculaire
Raideur
Incoordination motrice
Ralentissement des mouvements fins

Signes d'examen

ROT vifs
Spasticité
Parésie motrice
Signe de Babinski et signe de Hoffman
Affect pseudo-bulbaire (labilité émotionnelle, "rire et pleurer spasmodique")
Exagération du réflexe massétérin

Dysfonctionnement du MNP

Symptômes

Fatigue
Faiblesse musculaire
Crampes
Fasciculations
Incoordination motrice

Signes d'examen

Faiblesse musculaire
Amyotrophie
Fasciculations
Faiblesse ou abolition des ROT
Hypotonie

MNC : Motoneurone Central
MNP : Motoneurone Périphérique
ROT : Réflexes ostéo-tendineux

Electro-neuro-myogramme : le complément indispensable de l'examen clinique

L'électro-neuro-myogramme (ENMG) permet de confirmer l'existence d'une atteinte du motoneurone périphérique et de préciser son extension (Pouget, 2006). L'étude en détection à l'aide d'une électrode concentrique permet de rechercher des anomalies évoquant une atteinte du MNP en territoire cliniquement atteint, mais également sur des muscles non déficitaires et non atrophiés. Au repos, on peut objectiver une activité spontanée anormale : potentiels de fibrillation, potentiels lents de dénervation, fasciculations. Au cours de l'effort volontaire, le recrutement en UM est appauvri (reflétant la perte en motoneurones fonctionnels), avec une exagération de la fréquence de pulsation (tracés simples et accélérés, « neurogènes »). Les potentiels d'unité motrice (PUM) peuvent être de grande amplitude et de durée augmentée, témoignant du processus de réinnervation. L'exploration électrophysiologique permet également d'exclure d'autres affections, par l'étude de la conduction motrice (absence de signes de démyélinisation) et de la conduction sensitive (absence d'anomalies sensibles significatives pour l'âge).

3.2 Critères diagnostiques

3.2.1 Critères de l'El Escorial révisés

Les critères diagnostiques de la SLA ont été définis en 1994 par la Fédération Mondiale de Neurologie (critères dit de l'El Escorial) (Brooks, 1994) et révisés en 1998 (Airlie House) (Brooks et al., 2000). Ils incluent la présence de signes d'atteinte du MNP (cliniques, électrophysiologiques ou neuropathologiques), de signes d'atteinte du MNC (cliniques), et une évolution constante marquée par l'extension progressive des paralysies aux différentes régions spinales et bulbaire (Tableau 3). Le degré d'extension de l'atteinte motrice et l'atteinte respective du MNC et du MNP permettent une classification des patients en SLA « cliniquement définie », « cliniquement probable », « probable sur des arguments paracliniques » ou « possible » (Tableau 4).

Tableau 3: Principaux signes d'atteinte du MNC et du MNP dans les quatre régions du système nerveux (critères révisés d'El Escorial)

Sources: Brooks et al., 2000

Régions	Topographie des signes d'atteinte du MNP : déficit moteur, atrophie et fasciculations	Signes d'atteinte du MNC
Cervicale	<ul style="list-style-type: none"> - Cou, avant-bras et bras, main - Diaphragme 	<ul style="list-style-type: none"> - ROT vifs - ROT préservé dans un territoire amyotrophié - Signe de Hoffmann - Spasticité
Dorsale	<ul style="list-style-type: none"> - Dos - Abdomen 	<ul style="list-style-type: none"> - Abolition du réflexe cutané-abdominal
Lombo-sacrée	<ul style="list-style-type: none"> - Dos, abdomen - Cuisse, jambe et pied 	<ul style="list-style-type: none"> - ROT vifs - ROT préservé dans un territoire amyotrophié - Signe de Babinski - Spasticité
Tronc cérébral	<ul style="list-style-type: none"> - Mâchoire, face - Palais - Langue - Larynx 	<ul style="list-style-type: none"> - Spasticité - Clonus de la mâchoire - Réflexe du voile et masséterin exagérés - Affect pseudo-bulbaire - Bâillements fréquents

MNC : Motoneurone Central

MNP : Motoneurone Périphérique

ROT : Réflexes ostéo-tendineux

Tableau 4: Critères révisés de l'El Escorial (Brooks et al., 2000)

SLA définie
► signes d'atteinte du MNC et du MNP dans la région bulbaire et dans 2 régions spinales ou signes d'atteinte du MNC et du MNP dans 3 régions spinales
SLA probable
► atteinte du MNC et du MNP dans au moins 2 régions, certains signes d'atteinte du MNC étant situés au dessus des signes d'atteinte du MNP
SLA probable sur des arguments paracliniques
► atteinte du MNC et du MNP dans au moins 1 région ou atteinte du MNC dans 1 région, et atteinte du MNP à l'ENMG* dans au moins 2 membres
SLA possible
► signes d'atteinte du MNC et du MNP dans une seule région ou ► signes d'atteinte du MNC dans 2 territoires ou plus ou ► signes d'atteinte du MNP dans 1 territoire et signes d'atteinte du MNC sous jacents

MNC : motoneurone central

MNP : motoneurone périphérique

ENMG : électro-neuro-myogramme

*Les critères ENMG retenus pour authentifier le dysfonctionnement du MNP sont *l'association de signes de dénervation active et de dénervation chronique* lors de l'enregistrement par électrode aiguille concentrique :

- Dénervation active (enregistrement au repos) : potentiels de fibrillation, potentiels lents de dénervation
- Dénervation chronique (enregistrement au cours de l'effort volontaire) : potentiels d'unité motrice (PUM) de durée augmentée, souvent polyphasiques et d'amplitude augmentée; diminution du tracé interférentiel avec accélération de la fréquence de recrutement (>10Hz) en l'absence d'atteinte significative du MNC; PUM instables.

La combinaison de signes de dénervation active et de signes de dénervation chronique est nécessaire mais leur importance relative peut varier d'un muscle à l'autre.

Les fasciculations sont reconnues comme un trait clinique caractéristique mais ne sont pas retenues comme indispensables au diagnostic ENMG d'atteinte du MNP.

3.2.2 Elargissement des critères diagnostiques : les critères d'Awaji

Les critères de l'El Escorial, ainsi que leur version révisée, ont été établis initialement pour une utilisation dans le cadre de la recherche et en particulier des essais thérapeutiques. Ils sont peu sensibles et trop restrictifs pour le diagnostic de SLA en pratique clinique. Ainsi, dans une étude prospective sur 6 ans ayant inclus 388 patients atteints de SLA, plus de la moitié des patients ne pouvaient pas être classifiés comme "SLA définie" ou "SLA probable" au moment du diagnostic, et 10% d'entre eux ne l'étaient toujours pas au moment du décès lié à la pathologie (Traynor et al., 2000). Il est ensuite apparu que cette disparité était liée en grande partie à un usage trop restrictif des données électrophysiologiques (de Carvalho et al., 2011). Les critères d'Awaji (de Carvalho et al., 2008) proposent donc de modifier les critères de l'El Escorial sur 2 points :

- Dans une région anatomique donnée, les anomalies nécessaires à la mise en évidence d'un dysfonctionnement du MNP peuvent provenir indifféremment de l'examen clinique ou de l'ENMG
- Modification de l'importance accordée aux fasciculations : les critères d'Awaji considèrent les potentiels de fasciculation complexes et instables comme des *signes de dénervation active*, et les rendent donc "équivalents" à la constatation de potentiels de fibrillation ou de potentiels lents de dénervation.

Si le premier point semble relativement consensuel (considérer l'ENMG comme une prolongation de l'examen clinique pour attester du dysfonctionnement du MNP), le deuxième reste encore débattu à l'heure actuelle (Benatar et Tandan, 2011). Les fasciculations sont en fait considérées habituellement comme étant la manifestation d'une "irritation" de l'UM (Wettstein, 1979) et ne peuvent donc, *stricto sensu*, être assimilées à un signe de dégénérescence du MNP. Même si leur constatation est évocatrice du diagnostic de SLA, elles n'en sont pas spécifiques, comme d'ailleurs les autres anomalies objectivables à l'ENMG. Les premières études montrent cependant que l'application des critères d'Awaji peut s'accompagner d'une augmentation de la sensibilité diagnostique sans perte en spécificité (Okita et al., 2011), à condition d'intégrer l'ancienne catégorie "probable sur des arguments paracliniques" (requérant l'atteinte associée du MNC dans une seule région) au sein de la catégorie "probable" selon les critères d'Awaji (Boeckstein et al., 2010; Higashihara et al., 2012).

3.2.3 Diagnostics différentiels

En l'absence de marqueur spécifique, le diagnostic de SLA reste donc actuellement un diagnostic « syndromique ». De nombreuses pathologies (Tableau 5) dont le tableau clinique peut faire évoquer une SLA doivent être éliminées, en particulier quand l'atteinte "périphérique" est au premier plan. C'est le cas de certaines affections endocriniennes (hyperthyroïdie, hyperparathyroïdie), dysimmunitaires (lymphome, syndrome de Sjögren primitif ou secondaire), paranéoplasiques, infectieuses (infection par le VIH, syndrome post-polio) ou encore certaines pathologies musculaires comme la myosite à inclusions.

3.3 Signes cliniques inhabituels

Certains signes négatifs sont classiquement nécessaires au diagnostic : absence de signes sensitifs objectifs, de signes cérébelleux, d'atteinte sphinctérienne (mais des impériosités mictionnelles ou une dysurie modérée peuvent en fait se rencontrer) ou oculomotrice (Swash, 2000).

Cas particulier des troubles cognitifs, association SLA-DFT

L'atteinte cognitive est classiquement considérée comme rare dans la SLA. Cependant, des troubles cognitifs touchant particulièrement les fonctions exécutives frontales sont en fait relativement fréquents (Abrahams et al., 2005; Schreiber et al., 2005), alors que l'atteinte de la mémoire et du langage semble plus rare (Abrahams *et al.*, 2005). Lorsqu'elles sont recherchées de façon systématique, ces perturbations des fonctions exécutives frontales peuvent toucher jusqu'à la moitié des patients (Lomen-Hoerth et al., 2003). Elles peuvent s'accompagner de troubles comportementaux avec modifications des traits de caractère (Lomen-Hoerth et al., 2003) et d'anomalies des compétences sociales (Cavallo et al., 2011). De surcroît, 5-15% des patients vont développer un véritable tableau de démence de type fronto-temporal (Ince, 2000; Cavallo et al., 2011), pouvant précéder ou accompagner l'apparition de l'atteinte motrice. Ces formes SLA-DFT sont plus fréquentes en cas de début bulbaire. L'existence d'un "chevauchement" entre la SLA et la DFT est reconnue depuis de nombreuses années (Lomen-Hoerth et al., 2002) et a été confirmée par les découvertes récentes de mutations sur des gènes (TARDBP, C9ORF72) pouvant être responsables de tableaux de SLA et/ou de DFT.

Tableau 5 : Principales pathologies pouvant faire évoquer ou s'accompagner d'une atteinte motoneuronale

Adapté de Pradat et Bruneteau, Conférence de consensus pour la prise en charge des personnes atteintes de SLA (Pradat et Bruneteau, 2006)

Tableau d'atteinte isolée du MNC
<ul style="list-style-type: none"> ▶ Forme progressive de sclérose en plaques ▶ Paraparésie spastique tropicale (HTLV1) ▶ Paraparésie spastique héréditaire ▶ Adrénomyélongueuropathie
Atteinte médullaire focale
<ul style="list-style-type: none"> ▶ Myélopathie cervicarthrosique ▶ Syringomyélie ▶ Ischémie médullaire
Tableau d'atteinte isolée du MNP
<ul style="list-style-type: none"> ▶ Neuropathie multifocale avec blocs de conduction persistants ▶ Myosite à inclusion ▶ Amyotrophie spinale progressive de l'adulte ▶ Amyotrophie bulbo-spinale liée à l'X (syndrome de Kennedy) ▶ Syndrome du défilé thoraco-brachial ▶ Syndrome "crampes-fasciculations bénignes"
Symptomatologie bulbaire pure
<ul style="list-style-type: none"> ▶ Myasthénie ▶ Envahissement tumoral de la base du crâne ▶ Tumeur du tronc cérébral ▶ Malformation de la charnière (Arnold-Chiari) ▶ Syringobulbie
Atteintes du motoneurone secondaires / autres
<ul style="list-style-type: none"> ▶ Infection par le VIH ▶ Syndrome post-polio ▶ Syndrome d'Hirayama ▶ Dysthyroïdies ▶ Hyperparathyroïdie ▶ Pathologies autoimmunes (syndrome de Gougerot-Sjögren) ▶ Syndrome paranéoplasique, lymphome ▶ Déficit en hexosaminidase A

MNC : Motoneurone Central

MNP : Motoneurone Périphérique

3.4 Formes cliniques

3.4.1 Formes à début spinal

L'apparition d'un déficit moteur des membres, habituellement asymétrique est le mode de révélation le plus fréquent de la maladie, entre 65 et 80% des cas environ selon les séries (Swash, 2000). Dans une série de près de 400 patients, les symptômes étaient situés primitivement aux membres supérieurs dans 18 % des cas, aux membres inférieurs dans 29 % des cas et à ces deux étages dans 11 % des cas (Traynor et al., 2000).

3.4.2 Formes bulbaires

Un début des symptômes au niveau de la sphère bulbaire est rapporté dans 20-25% des cas environ (Swash, 2000). Il est plus fréquent chez les femmes que chez les hommes (respectivement 45 % et 28 % dans la série de Traynor et collaborateurs). La dysarthrie y est le symptôme initial le plus fréquent (Traynor et al., 2000).

3.4.3 Formes "respiratoires"

L'atteinte respiratoire est habituelle dans l'évolution de la maladie, mais constitue rarement son mode de révélation (Mitsumoto et al., 1998a). Dans une série de 133 patients SLA, un début par des signes respiratoires était ainsi rapporté chez environ 2% des patients (Argyriou et al., 2005).

3.4.4 Les autres maladies du motoneurone apparentées à la SLA

D'autres entités cliniques ont été décrites qui s'inscrivent dans le cadre des « maladies du motoneurone », concept que nous devons à Brain (Brain, 1962) et dont l'usage varie dans les pays anglo-saxons et francophones.

La Paralyse Bulbaire Progressive (PBP)

La PBP se caractérise par une dégénérescence du MNC et/ou du MNP localisée aux motoneurones innervant les seuls muscles de la sphère bulbaire (Mitsumoto et al., 1998b). Elle est responsable de la paralysie progressive des muscles d'innervation bulbaire, sans diffusion aux autres territoires cliniques. C'est une entité rare, environ 2% de l'ensemble des maladies du motoneurone (Argyriou et al., 2005).

La Sclérose Latérale Primitive (SLP)

L'atteinte primitive et isolée des cordons latéraux de la moelle, dénommée Sclérose Latérale Primitive, a été décrite par Erb en 1875 (Erb, 1875). La SLP se caractérise classiquement par des signes d'atteinte du seul MNC (syndrome tétrapyrimal, spasticité, syndrome pseudobulbaire, absence d'atrophie). Le début des symptômes est insidieux, et la progression de la maladie est très lente, avec parfois de longues périodes de stabilisation (Le Forestier et al., 2001), contrairement à ce qui est habituellement observé dans la SLA.

Cependant, la SLP reste une entité clinique discutée. Quelques patients atteints de SLP vont développer par la suite un tableau de SLA typique. Cliniquement, certains patients vont présenter de façon inconstante des signes pouvant traduire un dysfonctionnement du MNP (crampes, fasciculations, atrophie modérée), associés à des signes électrophysiologiques fluctuants de dénervation et de réinnervation (Pringle et al., 1992; Le Forestier et al., 2001). Les différentes études neuropathologiques ne permettent pas non plus de distinguer clairement les 2 pathologies. Une diminution du nombre de motoneurones dans la corne antérieure de la moelle a en effet été décrite dans certains cas de SLP, associée à l'atteinte des cordons latéraux de la moelle et à une atrophie macroscopique du cortex prémoteur. Selon certains auteurs, des inclusions à l'ubiquitine peuvent être retrouvées dans la SLP, au niveau des MNC, mais aussi plus inconstamment au niveau du cortex frontotemporal et de l'hippocampe (Ince et al., 1998; Ince, 2000). Enfin, l'existence d'une atteinte extra-motrice dans certains cas de SLP, à type de dégénérescence modérée des cordons postérieurs, a été rapportée par plusieurs auteurs (Fisher, 1977; Beal et Richardson, 1981; Younger et al., 1988).

L'Atrophie Musculaire Progressive (AMP)

L'Atrophie Musculaire Progressive, décrite initialement par Aran (Aran, 1850), fut individualisée par Cruveilhier en 1853. C'est à cet auteur que l'on doit d'avoir rapporté l'amyotrophie à une atteinte des motoneurones de la corne antérieure de la moelle (Cruveilhier, 1853). L'AMP se caractérise par une atteinte isolée et progressive du MNP, sans signe clinique d'atteinte du MNC. L'AMP débute insidieusement à l'âge adulte, au niveau des petits muscles de la main, puis l'amyotrophie progresse lentement vers la racine des membres supérieurs, gagnant ensuite le tronc et éventuellement les membres inférieurs, sans atteinte des territoires bulbaires (Charcot, 1895). S'il n'existe pas cliniquement de signes d'implication des MNC, leur atteinte « infraclinique » à l'examen neuropathologique a été

rapportée (Ince, 2000). La présence d'inclusions immuno-réactives pour l'ubiquitine au niveau des MNP y a aussi été décrite (Ince et al., 1998).

Un continuum anatomo-clinique

Considérées auparavant comme des formes frontières de la SLA, la SLP, l'AMP et la SLA-DFT semblent en fait s'inscrire dans un même continuum anatomoclinique. Différents arguments cliniques, électrophysiologiques, neuropathologiques et génétiques supportent cette théorie. Ainsi, il est maintenant admis que les patients atteints de SLP peuvent présenter des signes cliniques et électrophysiologiques d'atteinte « a minima » des MNP, voire évoluer vers une SLA typique. La mise en évidence d'inclusions immunoréactives pour l'ubiquitine identiques à celles observées dans la SLA (non immunoréactives pour Tau ou l' $\alpha\beta$ cristalline) dans des cas de SLP et d'AMP, mais aussi de SLA-DFT, constitue un argument supplémentaire permettant de rapporter ces différents syndromes au même spectre neurodégénératif. Des inclusions immunoréactives pour l'ubiquitine similaires sont aussi retrouvées, au niveau du cortex et de l'hippocampe, dans certains cas de DFT sans signe clinique d'atteinte du MNC ou du MNP (DFT-U ou « motor neuron disease-type dementia ») (Jackson et Lowe, 1996). Ainsi, des entités clinico-pathologiques allant de l'atteinte isolée du MNP jusqu'à la DFT pure sont « reliées » par la présence d'inclusions ubiquitine positives. Récemment, la protéine TDP-43 a été identifiée comme le composant protéique principal de ces inclusions positives pour l'ubiquitine dans la SLA (Neumann et al., 2006), la SLA-DFT (Mackenzie et al., 2007) et la DFT-U (Davidson et al., 2007). Enfin, sur un plan génétique une même mutation SOD1 peut entraîner au sein d'une même famille l'apparition de tableaux de SLA, de SLP ou d'AMP (Cervenakova et al., 2000). La découverte des mutations TARDBP et C9ORF72, qui peuvent être responsables de tableaux de SLA, de SLA-DFT ou de DFT, a confirmé le chevauchement génétique entre ces différentes pathologies. Dans tous les cas, les facteurs déterminant la topographie des lésions neuropathologiques, et donc la présentation clinique, restent actuellement inconnus.

3.5 Evolution

3.5.1 Evaluation clinique de la progression

Dans la SLA, la perte en motoneurones entraîne une perte des fonctions motrices dont les conséquences fonctionnelles sont variables en fonction du ou des territoires atteints. De

nombreuses échelles fonctionnelles, basées sur des signes subjectifs et/ou sur les données de l'examen clinique ont ainsi été utilisées. L'évaluation des déficiences fonctionnelles utilise en premier lieu, à l'heure actuelle, l'échelle fonctionnelle ALS Functional Rating Scale révisée (ALSFRS-R). Pour l'évaluation des déficiences en rapport avec l'atteinte bulbaire, l'échelle de Norris bulbaire est souvent utilisée également. Enfin, en routine clinique, le testing musculaire manuel permet d'évaluer de façon semi-quantitative la perte de force musculaire.

Echelle ALS Functional Rating Scale révisée

L'échelle ALSFRS-R évalue l'atteinte fonctionnelle de la sphère bulbaire (parole, déglutition, salive), des membres (écriture, alimentation, hygiène, habillage, marche, montée des escaliers) et, dans sa version révisée, la fonction ventilatoire. Elle comporte 12 items, chacun gradué de 4 (fonction normale) à 0 (perte totale de fonction), réalisant une cotation de 0 à 48. Elle est basée exclusivement sur l'interrogatoire du patient et non sur son examen clinique. L'ALSFRS-R a été validée (Cedarbaum et al., 1999) et est actuellement utilisée dans la plupart des essais thérapeutiques.

Echelle de Norris bulbaire

L'échelle de Norris bulbaire utilise une cotation de 0 à 3 pour évaluer l'atteinte fonctionnelle touchant la parole, la déglutition, la mastication, la ventilation, la toux et le comportement émotionnel.

Testing musculaire manuel (MMT)

Le testing MMT, basé sur la méthode du Medical Research Council évalue la force développée en conditions isométriques par un score numérique allant de 0 (aucune activité décelable) à 5 (réponse normale). C'est une méthode simple mais qui présente une faible sensibilité aux variations aux extrémités de l'échelle de cotation (l'écart de force entre le grade 5 et le grade 4 pouvant représenter jusqu'à 40% d'écart de force (Beasley, 1961).

3.5.2 Variabilité évolutive

L'évolution de la SLA se fait vers l'aggravation progressive, mais le rythme de cette aggravation est très variable. La survie moyenne est évaluée entre 3 et 5 ans (Beghi et al., 2007). Cependant des délais évolutifs beaucoup plus prolongés (plus de 20 ans, le diagnostic

de SLA ayant été confirmé par l'autopsie) ne sont pas rares (Meininger, 1993; Grohme et al., 2001). Pour 25% des patients, la médiane de survie est de 6 mois environ après la première consultation. Elle est de 12 mois environ dans 25 % des cas et supérieure à 18 mois pour 50% des patients (Lacomblez et al., 1996). Cette variabilité évolutive rend impossible toute prédictivité évolutive, en dépit d'une meilleure connaissance des facteurs pronostiques.

3.5.3 Facteurs pronostiques

Les facteurs de risque les plus significatifs sont l'âge (un âge plus élevé étant un facteur prédictif de survie plus courte), la baisse de la capacité vitale (au dessous de 70%), la perte de poids et la baisse de l'index de masse corporelle, l'atteinte bulbaire ou respiratoire initiale, et une pente rapide de dégradation de la fonction musculaire (Chio et al., 2009; Beghi et al., 2011).

3.5.4 Survie prolongée ("long-term survivors")

Selon les études, la proportion de patients survivant plus de 10 ans est évaluée entre 10 et 20% (Beghi et al., 2011). Ces patients "survivants à long-terme" ("long-term survivors" des anglo-saxons) définis comme des patients présentant une survie supérieure à 5 ans après le début des symptômes, en l'absence de ventilation invasive par trachéotomie, représentaient ainsi 14% de la population SLA totale dans une étude récente (Mateen et al., 2010). Les facteurs expliquant ces survies prolongées restent mal connus. Une survie prolongée est associée à un âge jeune de début et à l'atteinte prédominante du MNC dans certaines études (Turner et al., 2003; Zoccolella et al., 2008), mais pas dans d'autres (Mateen et al., 2010). Des facteurs génétiques pourraient également être impliqués, et des survies prolongées ont été rapportées chez des patients porteurs de mutation SOD1 (survie parfois supérieure à 40 ans) (Weber et al., 2012).

4. Génétique

Si la SLA survient de façon apparemment sporadique dans la majorité des cas, environ 5% à 10% des patients rapportent un histoire familiale de la maladie (Camu et al., 1999; Byrne et al., 2011). Le premier gène impliqué dans la survenue de la SLA a été découvert en 1993 (Rosen et al., 1993). Il s'agit du gène SOD1 situé sur le chromosome 21. De nombreux gènes

associés à la maladie ont depuis été identifiés (Tableau 6). Certains contribuent dans une proportion importante aux cas de SLA familiales, comme les gènes SOD1, TARDBP (TAR DNA-binding protein), FUS (Andersen et Al-Chalabi, 2011); et le gène C9ORF72 (chromosome 9 open reading frame 72) de découverte récente qui serait impliqué dans une grande proportion de SLA familiales mais aussi sporadiques (Dejesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Le taux d'élucidation génétique des formes familiales est maintenant d'environ 75%, au moins deux tiers de ces cas étant liés à l'un des quatre gènes majeurs: SOD1, TARDBP, FUS et C9ORF72 (Turner et al., 2013).

4.1 Gène Superoxyde dismutase 1

SOD1, codant pour la superoxyde dismutase Cu/Zn cytosolique, est le premier gène à avoir été identifié dans la SLA (Rosen et al., 1993). Il y a maintenant plus de 160 mutations identifiées à ce jour sur ce gène de 153 codons, qui semblent toutes pathogènes (Al-Chalabi et al., 2012). La plupart sont des mutations faux-sens, les délétions et mutations non-sens étant beaucoup plus rares. Selon les séries et les populations étudiées, la fréquence des mutations SOD1 dans les formes familiales de SLA varie de 12% (Niemann et al., 2004) à 71% environ (Abe et al., 1996). Elle a été évaluée récemment à 12,3% dans une cohorte française (Millecamps et al., 2010). Ces mutations sont responsables d'un gain de fonction toxique de l'enzyme SOD1. Si l'activité dismutase est réduite dans la plupart des mutations, d'autres s'accompagnent d'une activité enzymatique normale ou quasi normale, sans corrélation entre la sévérité de la maladie et le degré d'activité dismutase (Andersen et al., 1995; Andersen et al., 1997). Le rôle principal de SOD1 est de protéger les cellules des lésions oxydatives en métabolisant les radicaux superoxyde (Gurney et al., 1994), mais de nombreux autres mécanismes physiopathologiques (comme l'excitotoxicité, le dysfonctionnement du métabolisme mitochondrial, les perturbations du transport axonal ou encore l'activation de l'apoptose) ont également été rapportés aux mutations SOD1 (Pasinelli and Brown, 2006). Le fait que toute mutation à presque n'importe quel endroit de la protéine puisse être responsable d'un tableau de SLA suggère qu'un gain de fonction toxique général est probablement en cause, comme par exemple un mécanisme d'agrégation anormale (Al-Chalabi et al., 2012). Cliniquement, les mutations SOD1 sont rarement associées à une DFT, et l'atteinte des MNP prédomine habituellement sur celle des MNC (Al-Chalabi et al., 2012). Sur un plan neuropathologique, les patients porteurs d'une mutation SOD1 présentent des inclusions immunoréactives pour la protéine SOD1 dans les motoneurones (inclusions hyalines "Lewy body-like") et les

astrocytes (inclusions hyalines astrocytaires) (Kato, 2008). Ces inclusions sont également réactives pour l'ubiquitine. Les inclusions présentes chez les patients porteurs d'une mutation SOD1 sont généralement négatives pour FUS (Deng et al., 2010), ou pour TDP43 (Mackenzie et al., 2007; Tan et al., 2007) sauf dans de rares cas rapportés (Maekawa et al., 2009; Okamoto et al., 2011). Un autre trait neuropathologique caractéristique des formes avec mutation SOD1 est l'atteinte souvent modérée du tractus corticospinal par comparaison avec l'atteinte des MNP, et l'atteinte possible des cordons postérieurs de la moelle (Kato, 2008).

4.2 Gène TAR DNA-binding protein

L'identification de TDP43 comme étant un composant protéique principal des inclusions immunoréactives pour l'ubiquitine, chez les patients atteints de SLA et dans les formes de démence frontotemporale avec inclusions ubiquitine-positives, a conduit à l'analyse du gène TARDBP dans les formes familiales de SLA. Depuis 2008, plus de 40 mutations ont été identifiées sur ce gène, le plus souvent de type faux-sens (Andersen et Al-Chalabi, 2011). TDP43 est impliquée dans le transcription, l'épissage, le transport et la traduction des ARN (Lagier-Tourenne et al., 2010). Ces mutations sont responsables d'une redistribution anormale de la protéine du noyau vers le cytoplasme des neurones. La fréquence des mutations TARDBP dans les formes familiales de SLA est évaluée entre 4 et 6% (Millecamps et al., 2010; Andersen et Al-Chalabi, 2011). Les mutations TARDBP sont le plus souvent responsables d'un phénotype de type SLA pouvant être associé, chez un même patient ou au sein d'une même famille, à un tableau de DFT se traduisant fréquemment par des modifications comportementales. L'atteinte initiale bulbaire (originellement rapportée comme étant plus fréquente) semble en fait autour de 25%, comparable à celle observée classiquement (Kato, 2008). Les lésions neuropathologiques sont comparables avec celles observées dans les cas de SLA sporadique incluant perte neuronale, gliose et corps de Bunina au niveau de la corne antérieure de la moelle, pâleur du tractus cortico-spinal, et présence d'inclusions cytoplasmiques TDP-43 positives au niveau des MNP et des MNC (Van Deerlin et al., 2008). Un co-marquage pour la protéine FUS a également été rapporté mais de façon inconstante. Il est possible que Fus ne soit présent qu'en faible quantité au sein des inclusions et des différences techniques pourraient alors expliquer ces résultats divergents (Deng et al., 2010).

4.3 Gène Fused in sarcoma

La découverte de mutations sur le gène TARDBP a conduit au screening de gènes similaires dont FUS. Comme TDP43, FUS (initialement nommé translocated in liposarcoma, TLS) est impliquée dans le métabolisme des ARN (Lagier-Tourenne et al., 2010). Plus de 40 mutations sur le gène FUS ont maintenant été rapportées, représentant 4 à 6% des formes familiales de SLA (Millecamps et al., 2010; Andersen et Al-Chalabi, 2011). Le phénotype associé est celui d'une SLA typique, mais est souvent rapporté comme rapidement évolutif (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009; Millecamps et al., 2010). Sur un plan neuropathologique, les patients porteurs d'une mutation FUS se caractérisent par une perte importante en motoneurones au niveau de la moelle épinière et la rareté des inclusions cytoplasmiques ubiquitine-positives en "écheveau", marqueur habituel de SLA (Vance et al., 2009). Les inclusions immunoréactives pour TDP43 sont considérées comme notablement absentes (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009), même si leur présence a été rarement rapportée (Deng et al., 2010).

Tableau 6 : Principaux gènes identifiés dans la SLA

Sources : (Koppers et al., 2013; Andersen et Al-Chalabi, 2011)

Base de données ALSod (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/index.aspx>)

<i>Nom</i>	<i>Locus</i>	<i>Gène</i>	<i>Protéine</i>	<i>Transmission</i>	<i>Caractéristiques cliniques</i>
ALS1	21q22	SOD1	Superoxide dismutase Cu/Zn	AD/AR	SLA typique, AMP Rarement : AFB, PBP
ALS2	2q33	ALSin	ALSin	AR	SLA juvénile avec prédominance des signes d'atteinte du MNC
ALS3	18q21	ND	-	AD	SLA typique, début spinal aux membres inférieurs
ALS4	9q34.	SETX	Senataxin	AD	SLA, début dans l'enfance ou adolescence, atteinte lentement progressive, pas d'atteinte respiratoire ou bulbaire
ALS5	15q15-21	SPG11	Spatacsin	AR	SLA juvénile, progression lente
ALS6	16p11.2	FUS	Fused in sarcoma	AD/AR	SLA typique, SLA-DFT
ALS7	20p13	ND	-	AD	SLA typique
ALS8	20q13	VAPB	VAMP-associated protein B	AD	SLA typique, AMP, PBP.
ALS9	14q11	ANG	Angiogenin	AD	SLA typique, SLA-DFT, PBP, syndrome parkinsonien
ALS10	1q36	TARDBP	TAR-DNA binding protein	AD	SLA typique, SLA-DFT
ALS11	6q21	FIG4	PI(3,5)P(2)5-phosphatase	AD	SLA avec atteinte du MNC prédominante, SLP
ALS12	10p13	OPTN	Optineurin	AD/AR	SLA, début à l'âge adulte
ALS13	12q23-24	ATXN2	Ataxin 2	AD	SLA
ALS14	9p13	VCP	Valosin-containing protein	AD	SLA, SLA-DFT
ALS-FTD1	9q21-22	ND	-	AD	SLA, DFT
ALS-FTD2	9p13.2-21.3	C9ORF72	Chromosome 9 open reading frame 72	AD	SLA, DFT, SLA-DFT
ALS-FTDP	17q21.1	MAPT	Microtubule associated protein tau	AD	SLA avec DFT et parkinsonisme
ALS-X	Xcen	ND	-	XD	Début à l'âge adulte

AFB : Atrophie Focale Bénigne

AMP : Atrophie Musculaire Progressive

DFT : Démence Fronto-Temporale

PBP : Paralysie Bulbaire Progressive

ND : Non Déterminé

SLP : Sclérose Latérale Primitive

4.4 Chromosome 9 open reading frame 72

L'existence d'une origine génétique commune entre la SLA et la DFT a été suggérée dès 1991 lorsque l'existence de cas de SLA, de DFT et de SLA-DFT a été rapportée au sein de plusieurs générations d'une famille suédoise (Gunnarsson et al., 1991). La liaison entre la SLA-DFT et le locus 9p21.2 avait ensuite été démontrée dès 2006 (Vance et al., 2006), puis confirmée dans la SLA (Laaksovirta et al., 2010). Fin 2011, l'anomalie génétique responsable a finalement été identifiée par deux groupes différents (Dejesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Il s'agit de l'expansion anormale d'un hexanucléotide GGGGCC dans le premier intron du gène C9ORF72. Les individus normaux ont un maximum de 23 répétitions, alors que les sujets atteints de SLA ou de DFT peuvent en présenter plusieurs centaines (Andersen and Al-Chalabi, 2011). La fonction de la protéine codée par le gène C9ORF72 reste actuellement inconnue, et son "knockdown" est bien toléré chez la souris (Lagier-Tourenne et al., 2013). Les régions introniques étant non codantes, l'expansion toxique ne se retrouve pas sur la protéine. De nombreuses avancées ont eut lieu en 2 ans dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques en cause (Gendron et al., 2014). Ceux-ci incluent des phénomènes toxiques liés à la transcription de la séquence répétée en fragments d'ARN. Ces transcrits sens et anti-sens sont séquestrés dans le noyau sous forme de foyers ou "foci" et vont interagir avec diverses protéines de liaison à l'ARN en altérant leur fonctionnement. Ces "foci" sont retrouvés au niveau du cortex frontal, du cortex moteur, de la moelle épinière, du cervelet et de l'hippocampe. Ils sont principalement intra-neuronaux mais peuvent également être retrouvés dans les cellules gliales (Lagier-Tourenne et al., 2013; Gendron et al., 2014). Les molécules ARN sens et anti-sens peuvent également être traduites en différents polypeptides, la présence des répétitions permettant l'initiation de la traduction selon les 3 phases de lecture, indépendamment de la présence d'un codon initiateur ATG (Zu et al., 2011). Ces polypeptides s'accumulent et forment des inclusions neuronales dans les régions affectées du cerveau, en particulier cortex frontal, cortex moteur et hippocampe; et dans la moelle épinière (Zu et al., 2013). Ces agrégats dipeptidiques pourraient être toxiques pour les neurones et ainsi constituer une des clés physiopathologiques chez les patients porteurs d'une mutation C9ORF72. Enfin, un troisième mécanisme de toxicité, par perte de fonction de la protéine codée, est aussi à envisager (Gendron et al., 2014).

De nombreux travaux ont également cherché à déterminer le profil clinico-pathologique des patients porteurs d'une mutation C9ORF72. Cette mutation est présente dans environ 40% des cas de SLA familiale (jusqu'à plus de 60% dans les populations suédoises et belges) (Byrne et

al., 2012b; Majounie et al., 2012; Millecamps et al., 2012). L'âge de début de la maladie se situe plus fréquemment dans la 5ème ou la 6ème décade et les formes bulbaires sont évaluées autour de 25% (Rademakers and van, 2013), même si une fréquence plus élevée - autour de 40% - a aussi été rapportée (Millecamps et al., 2012). L'atteinte cognitive (modifications cognitivo-comportementales, DFT) semble également très fréquente, touchant jusqu'à 50% des patients (Byrne et al., 2012b; Hodges, 2012). L'existence de symptômes psychotiques et/ou d'antécédents familiaux psychiatriques est également plus fréquente chez les porteurs de la mutation C9ORF72 (Devenney et al., 2014). L'évolution semble rapidement progressive, la plupart des patients décédant dans un délai de 3 ans après le début de la maladie (Byrne et al., 2012b). Enfin, certains patients développent leurs premiers symptômes avant l'âge auquel le firent leurs parents, ce qui fait suspecter un phénomène d'anticipation (Chio et al., 2012). Sur un plan neuropathologique, les patients porteurs d'une mutation C9ORF72 présentent une perte en motoneurones de la corne antérieure et la présence d'inclusions TDP43 positives en "écheveau" dans les motoneurones spinaux restants. Associés à ces anomalies classiques dans la SLA, des aspects inhabituels ont été rapportés avec la présence fréquente d'inclusions neuronales intranucléaires et cytoplasmiques, TDP43 négatives (mais ubiquitine et P62 positives), dans l'hippocampe et le cortex cérébelleux (Al-Sarraj et al., 2011). Ces agrégats TDP43-négatifs semblent caractéristiques de la présence d'une mutation C9ORF72 et seraient constitués en grande partie de chaînes dipeptidiques provenant de la traduction "illégitime" de l'expansion intronique GGGGCC (Mackenzie et al., 2013; Mori et al., 2013).

4.5 SLA "sporadiques"

La SLA "sporadique" est considérée actuellement comme une pathologie complexe à laquelle vont contribuer des facteurs à la fois environnementaux et génétiques. De nombreux gènes ont ainsi été associés à la survenue d'un SLA sporadique (Tableau 7) mais leur contribution précise dans la survenue de la maladie reste souvent difficile à déterminer.

La distinction entre SLA sporadique et SLA familiale est en partie artificielle puisque des mutations responsables de formes familiales sont retrouvées, dans un nombre non négligeable de cas, chez des patients présentant une SLA d'apparence sporadique (Al-Chalabi et al., 2012). De surcroît, il n'existe pas, à l'heure actuelle de consensus sur la définition du caractère "familial" dans la SLA comme probablement dans d'autres pathologies neurodégénératives (Byrne et al., 2012a). Le phénotype clinique des SLA familiales étant comparable à celui des SLA sporadiques à l'exception de la présence d'antécédents familiaux de la maladie, des cas

de SLA d'apparence sporadiques peuvent en fait être familiaux. Les exemples de situations où l'absence d'histoire familiale peut conduire à tort à conclure au caractère sporadique sont multiples (Belzil et Rouleau, 2012) : petites familles, méconnaissance de l'état de santé des parents, ou encore SLA non diagnostiquée chez les parents du sujet. C'est le cas également si le lien entre la pathologie présentée par le parent et celle du sujet atteint de SLA n'a pas été fait, comme ce fut le cas pendant de nombreuses années pour la DFT. Une variation significative de l'âge de début des symptômes, en particulier lorsqu'il existe un phénomène d'anticipation comme cela pourrait être le cas pour la mutation C9ORF72, peut également conduire à une méconnaissance du caractère familial, le parent porteur de la mutation étant encore asymptomatique ou décédé d'une autre pathologie. La découverte de la mutation C9ORF72, qui est présente dans une proportion relativement importante chez des patients atteints de SLA d'apparence sporadique et peut être responsable au sein d'une même famille de tableaux clinique différents (SLA, DFT ou SLA-DFT), pourrait ainsi conduire à une modification de pratiques concernant le testing génétique chez ces patients.

Tableau 7 : Principaux gènes associés avec la SLA sporadique

Sources : (Corrado et al., 2007; Andersen et Al-Chalabi, 2011; van Es et al., 2011; Koppers et al., 2013)

<i>Nom</i>	<i>Protéine</i>	<i>Type d'association</i>	<i>Informations complémentaires</i>
APEX	Apurinic endonuclease, DNA repair enzyme	Association de SNP	Association inconstamment retrouvée selon les études avec l'allèle APEX1 D184E. Protéine impliquée dans la réparation de l'ADN.
ANG	angiogenin	Mutations	Les mutations sur ANG sont responsables de formes familiales (ALS9). Dix-sept mutations faux-sens ont été décrites mais seule la mutation la plus fréquente, p.Lys17Ile, a été démontrée comme ségrégant chez tous les membres atteints d'une famille néerlandaise. Des mutations ont également été rapportées chez des sujets sains, ce qui suggèrent que toutes les mutations ne sont pas pathogènes. Fréquence significativement plus élevée de variants du gène ANG chez des patients atteints de SLA mais également de la Maladie de Parkinson : possible reflet d' une susceptibilité génétique globale aux pathologies neurodégénératives.
ATXN2	Ataxin 2	Expansion polyQ	Les expansions de polyglutamine de longueur intermédiaire sur l'ataxin2 augmentent le risque de SLA sporadique. Interaction avec TDP43.
CHMP2B	Chromatin modifying protein 2B	Mutations	Mutations connues pour être responsables de DFT. Les patients ont une atteinte du MNP réalisant un tableau de type AMP.
HFE	Protéine HFE	Association de SNP	Association inconstamment retrouvée avec le polymorphisme HFE H63D. Protéine régulant le métabolisme du fer. Les mutations sur HFE sont responsables de l'hémochromatose héréditaire.
NEFH	Chaîne lourde du neurofilament	Délétions/insertions/ mutations du domaine KSP du gène	Association inconstamment retrouvée. Un des marqueurs neuropathologiques de SLA est la présence d'inclusions neurofilamentaires au niveau des motoneurones.
SMN1	Survival motor neuron 1	Nombre anormal de copies	Les délétions ou mutations sur SMN1 sont responsables du tableau d'AMS autosomale récessive. La duplication SMN1 est un facteur de risque de SLA sporadique dans certaines populations.
SMN2	Survival motor neuron 2	Délétions	Les variations du nombre de copies de SMN2 affectent la sévérité de l'AMS autosomale récessive.
PON 1, 2, 3	Paraoxonase	Associations de SNP/Mutations	Association inconstamment retrouvée selon les études. Possible interaction gène-environnement..
PRPH	Périphérine	Mutations	La périphérine est un filament intermédiaire et est un des composants des inclusions visibles dans la SLA sporadique.
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Association de SNP	Association inconstamment retrouvée. La délétion de l'élément HRE du promoteur du gène VEGF est responsable d'un phénotype SLA chez la souris.

AMP : atrophie musculaire progressive, HRE : hypoxia response element, SNP : Single Nucleotide Polymorphism, DFT : démence frontotemporale, MNP : motoneurone périphérique, AMS : amyotrophie spinale

Cas particulier de la mutation C9ORF72

La fréquence de la mutation C9ORF72 dans les formes apparemment sporadiques de SLA est ainsi évaluée à 6% globalement dans la population mondiale (Rademakers et van Blitterswijk, 2013), mais avec des disparités importantes en fonction des populations étudiées (jusqu'à 21% dans la population finlandaise (Renton et al., 2011)). Elle a été évaluée à 8% des SLA sporadiques dans la population française (Millecamps et al., 2012). Les dernières recommandations (EFNS guidelines) étaient en effet de proposer une recherche génétique aux patients rapportant des antécédents familiaux de SLA ou de DFT et de rassurer les patients classés comme sporadiques sur le fait que les membres de leur famille ne présentaient pas de risque accru de pathologie neurodégénérative (Burgunder et al., 2011). Cette attitude est actuellement remise en cause par certains (Majounie et al., 2012) qui estiment que la recherche de mutation C9ORF72 pourrait être proposée de façon systématique chez les patients atteints de SLA ou de DFT, en tant qu'outil diagnostique. D'autres suggèrent l'utilisation d'un algorithme de sélection clinique des patients afin de proposer cette recherche génétique uniquement à ceux qui ont des antécédents familiaux de SLA ou de DFT, ou bien qui présentent des anomalies sur les échelles de comportement frontal (Byrne et al., 2012b).

De nombreuses incertitudes demeurent également actuellement concernant la pénétrance et l'étendue des phénotypes cliniques associés à cette mutation (Rademakers et van Blitterswijk, 2013), ainsi que sur le plan technique : la longueur minimale nécessaire pour que l'expansion soit pathogène n'est pas connue et les techniques de détection utilisées actuellement (repeat-primed PCR) sont au mieux semi-quantitatives. Les études à venir, sur de large séries de patients et utilisant la technique du Southern-blotting, devraient permettre de déterminer le seuil de pathogénicité de l'expansion et de clarifier le rôle des expansions de taille intermédiaire (23-700 répétitions), et ainsi d'apporter de nouveaux éléments de réponse pour le testing génétique des patients atteints de SLA d'apparence sporadique.

5. Physiopathologie de la SLA

5.1 Principaux modèles animaux

L'identification des principaux gènes responsables de la SLA est à la base du développement de modèles animaux expérimentaux de la maladie. L'analyse des principaux modèles animaux

de SLA, et en particulier du modèle SOD, a ainsi permis de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA.

5.1.1 Mutant ciblés

Rongeurs transgéniques porteurs d'une mutation SOD1

L'enzyme SOD1 est une enzyme homodimérique cytoplasmique, ubiquitaire, qui catalyse la dismutation des ions superoxydes responsables du stress oxydatif impliqué dans de nombreuses pathologies neurodégénératives (McGoldrick et al., 2013). Il fut donc initialement envisagé que les mutations pathogènes sur SOD1 s'accompagnaient d'une diminution de l'activité dismutase. Il a été montré par la suite que la présence d'une sous-unité SOD1 mutée ne modifiait pas l'activité de la sous-unité SOD1 sauvage (Borchelt et al., 1995) et que les souris totalement déficientes en SOD1 (souris "knock-out" SOD1 $-/-$) ne présentaient pas dysfonction motrice jusqu'à l'âge de 6 mois (Reaume et al., 1996). L'absence de SOD1 s'accompagne tout de même d'une augmentation du stress oxydatif et d'une augmentation de l'atrophie musculaire liée à l'âge, constituant plutôt un modèle de sarcopénie (Muller et al., 2006).

Les mutations de l'enzyme SOD1 s'accompagnent donc d'un gain de fonction toxique dont la nature exacte n'est pas encore élucidée (Boillee et al., 2006a). L'identification de mutations dans le gène SOD1 a permis la création de lignées de souris transgéniques exprimant différentes mutations sur la SOD1 humaine ou murine. La première description d'une souris transgénique exprimant une mutation SOD1 humaine a été publiée par Gurney et collaborateurs en 1994 (Gurney et al., 1994). Plus de 10 lignées de souris transgéniques porteuses d'une mutation SOD1 sont disponibles à ce jour. Les rongeurs transgéniques porteurs d'une mutation SOD1 présentent un phénotype variable en termes d'âge de début de la maladie et de vitesse de progression. Le développement des symptômes est principalement dépendant de 4 facteurs (McGoldrick et al., 2013) : le type de mutation SOD1 exprimé, le niveau d'expression du transgène, le genre et le terrain génétique. Les rongeurs transgéniques porteurs d'une mutation SOD1 présentent des caractéristiques pathologiques communes avec celles observées dans la SLA : perte en motoneurones avec gliose, présence d'inclusions hyalines "Lewy-body like" dans les motoneurones et d'inclusions hyalines astrocytaires (Kato, 2008). Ces modèles présentent tout de même une différence fondamentale avec les formes sporadiques de SLA et les formes familiales non liées à une mutation SOD1 : l'absence de mise en évidence (ou alors au stade terminal de la maladie) d'inclusions cytoplasmiques

immunoréactives pour la protéine TDP43, considérées à l'heure actuelle comme un marqueur neuropathologique fondamental de la forme humaine de la maladie (Robertson et al., 2007; Shan et al., 2009).

Les modèles de rongeurs porteurs d'une mutation SOD1 sont à la base des connaissances actuelles sur de nombreux mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA, comme le stress oxydant, mais aussi le rôle de l'excitotoxicité, les anomalies mitochondriales, les perturbations du transport axonal ou les phénomènes d'agrégation protéique. Si la mort des motoneurones est un phénomène majeur dans la SLA, la question de l'origine cellulaire "motoneuronale" de la maladie a été remise en question par plusieurs études dans le modèle SOD. L'expression de la SOD1 mutée spécifiquement dans les motoneurones semble en effet n'avoir qu'une importance marginale et plusieurs études ont montré qu'elle n'était pas suffisante pour induire la pathologie (Pramatarova et al., 2001; Lino et al., 2002). D'autres éléments allant dans ce sens ont émergé de l'analyse de souris chimériques constituées à la fois de cellules normales et de cellules exprimant la protéine SOD1 mutée (Clement et al., 2003). Ces travaux ont montré que des animaux présentant une petite proportion de cellules "environnementales" saines pouvaient ne pas développer la maladie en dépit d'une expression élevée de SOD1 mutée dans les motoneurones. L'expression de la protéine SOD1 mutée au sein des motoneurones, même à des niveaux s'accompagnant d'une atteinte motrice précoce et rapidement évolutive lorsque la mutation est exprimée de façon ubiquitaire, n'est donc pas suffisante pour entraîner la dégénérescence des motoneurones. L'analyse de souris porteuses d'une mutation SOD1 pouvant être supprimée sélectivement, via un système de recombinaison CRE-Lox, a permis de mieux préciser le rôle des différents types cellulaires (Boillee et al., 2006b) et en particulier des cellules gliales. L'excision du mutant SOD1 au sein des motoneurones retarde le début des symptômes moteurs et ralentit la phase d'évolution précoce de la maladie. A l'inverse, la diminution du niveau d'expression de la protéine SOD1 mutée au niveau de la microglie et des macrophages périphériques a peu d'effet sur le début des symptômes mais ralentit fortement la progression de la maladie et allonge la survie globale de façon très significative. D'autres travaux suggèrent que l'astrocyte pourrait également jouer un rôle significatif dans la toxicité sur le motoneurone et la progression de la maladie (Nagai et al., 2007; Yamanaka et al., 2008). La perte en synapses neuromusculaires est le premier évènement cellulaire identifiable dans le modèle SOD (Fischer et al., 2004; Vinsant et al., 2013) et certains travaux suggèrent que le muscle pourrait également contribuer à l'initiation de la maladie (Jokic et al., 2006; Dupuis et al., 2009). Les anomalies de la

jonction neuromusculaire et du muscle présentes dans la SLA font l'objet d'un chapitre spécifique (voir "Troisième Partie : Altérations de la jonction neuromusculaire dans la SLA").

Modèles animaux liés à la présence d'une mutation ou d'une perte de fonction de la protéine TDP43

Les mutations sur le gène TARDBP, codant pour la protéine TDP43 sont une des causes génétiques de la SLA. Les fonctions de TDP43 sont nombreuses et cette protéine est impliquée dans le transcription, l'épissage, le transport et la traduction des ARN (Lagier-Tourenne et al., 2010). L'effet des mutations pathogènes sur le rôle de TDP43 reste mal compris et des mécanismes à type de gain et de perte de fonction ont été proposés. Plusieurs groupes ont essayé de mettre au point un modèle de SLA "liée à TDP43" chez le rongeur, avec des résultats variables en termes de phénotype, aucun ne répliquant à ce jour le phénotype de la SLA humaine. Le phénotype observé chez le rongeur est, comme pour le modèle SOD1, très dépendant du promoteur utilisé et du niveau d'expression du transgène, mais ces modèles semblent présenter surtout une dégénérescence axonale avec une mort motoneuronale relativement peu marquée (McGoldrick et al., 2013). L'absence complète d'expression de TDP43 chez le souris entraîne la mort précoce de l'embryon, en rapport avec le rôle essentiel probable de TDP43 dans le développement (McGoldrick et al., 2013). Enfin, contrairement au modèle SOD, la surexpression de la protéine TDP43 humaine normale s'accompagne chez la souris de lésions neurodégénératives significatives (Xu et al., 2010).

Modèles animaux liés à la surexpression de la protéine FUS native ou mutée

Des mutations affectant la structure et la fonction de la protéine FUS, dont la fonction première est de servir de protéine de liaison à l'ARN, sont responsables de certaines formes familiales de SLA. Le développement de modèles animaux de SLA "liée à FUS" devrait permettre de mieux comprendre par quels mécanismes ces mutations entraînent la maladie, et également le rôle des anomalies du métabolisme des ARN dans la neurodégénérescence.

L'absence complète d'expression de FUS (knock-out) chez la souris n'est pas létale mais résulte en un poids de naissance inférieur, une augmentation de la sensibilité aux radiations ionisantes, une stérilité chez les mâles et une hypofertilité chez les femelles (Kuroda et al., 2000). Il n'y a que peu de travaux, à ce jour, étudiant l'effet de la surexpression de FUS (native ou mutée) chez le rongeur. La surexpression de la protéine FUS native s'accompagne d'une dégénérescence sévère des motoneurons de la moelle épinière chez la souris (Mitchell et al., 2013). Chez le rat, la surexpression de la protéine FUS mutée s'accompagne d'une

paralysie progressive avec dénervation musculaire évoquent un phénotype de SLA avec une perte substantielle en motoneurones corticaux, mais relativement modérée en motoneurones spinaux (Huang et al., 2011). La surexpression de la protéine FUS native n'entraîne pas de perte de fonction motrice mais s'accompagne, chez le rat âgé, de déficit cognitifs et d'une perte en motoneurones corticaux et de l'hippocampe (Huang et al., 2011).

5.1.2 Mutants spontanés

Souris Wobbler

Rapporté pour la première fois en 1956 (Falconer, 1956), la souris Wobbler est le mutant spontané avec dégénérescence motoneuronale le mieux caractérisé (Moser et al., 2013). La mutation causale a été identifiée en 2005, il s'agit d'une mutation ponctuelle récessive sur le gène VPS54 (facteur de tri de protéine vésiculaire 54) (Schmitt-John et al., 2005). Cette mutation n'a encore jamais été mise en évidence chez un patient atteint de SLA. Le phénotype de la souris Wobbler présente trois phases différentes (Boillee et al., 2003). Durant la phase précoce, présymptomatique (de la naissance à 3 semaines), la souris n'a que peu ou pas de symptômes. Entre 3 semaines et 3 mois après la naissance, apparaissent les anomalies cliniques : tremblement, ataxie, perte de poids, amyotrophie et déficit moteur. Durant cette phase d'évolution de la maladie apparaissent également des anomalies morphologiques marquées des motoneurones, en particulier une vacuolisation cytoplasmique. Le phénotype clinique reste ensuite stable de 3 mois jusqu'à la mort de la souris. Pour certains auteurs (Rathke-Hartlieb et al., 1999), la souris Wobbler serait cependant un modèle de neurodégénérescence diffuse et non restreinte aux motoneurones, du fait de la mise en évidence précoce de lésions neurodégénératives au niveau du thalamus, du cervelet et du tronc cérébral.

Souris pmn

La souris *pmn* (progressive motor neuronopathy) développe une dégénérescence progressive, cranio-caudale de ses axones moteurs à partir de 2 semaines postnatales et meurt rapidement, entre 4 et 6 semaines après la naissance. Il s'agit d'une mutation homozygote sur le gène TBCE (protéine chaperone E spécifique de la tubuline), situé sur le chromosome 13. La perte en motoneurones est objectivable dès le vingtième jour (Pioro et Mitsumoto, 1995). L'étude des axones moteurs montre également un nombre réduit de microtubules, probablement lié à un défaut de stabilisation (Martin et al., 2002).

Souris MND

La souris *MND* (motoneuron degeneration) présente une dégénérescence progressive des motoneurones associée à une altération progressive de ses fonctions motrices de début tardif (6 mois après la naissance) et meurt autour de 1 an. Elle était considérée initialement comme un modèle de maladie du motoneurone et en particulier de SLA. La souris *MND* a en fait été reconnue récemment comme étant un modèle de céréoïde-lipofuscinose neuronale, la mutation *MND* s'accompagnant d'une accumulation lysosomale de lipoprotéines identique à celle observée dans cette pathologie. La mutation *MND* a ensuite été identifiée sur le gène orthologue chez la souris du gène *CLN8* humain (homologie 82%), responsable d'une forme de céréoïde-lipofuscinose neuronale s'accompagnant d'une épilepsie et d'un retard mental (Ranta et al., 1999).

5.2 Hypothèses physiopathologiques

Les processus physiopathologiques mis en jeu dans la SLA sont multiples et ne sont pas encore totalement identifiés à ce jour. Parmi les mécanismes les mieux caractérisés, on peut citer l'excitotoxicité, les anomalies du stress oxydatif, l'instabilité protéique et la formation d'agrégats anormaux, le dysfonctionnement des mitochondries, les altérations du transport axonal, la neuroinflammation ou encore l'apoptose. La découverte de mutations pathogènes sur deux gènes codant pour des protéines impliquées dans le traitement des ARNs, *TDP43* et *FUS*, a récemment fait émerger le rôle probable des anomalies du métabolisme des ARNs (Ferraiuolo et al., 2011). Une grande partie de nos connaissances actuelles sur la physiopathologie de la SLA restent issues de l'étude du modèle *SOD1*, les mutations *SOD1* altérant de nombreuses fonctions cellulaires (Figure 5) (Pasinelli et Brown, 2006).

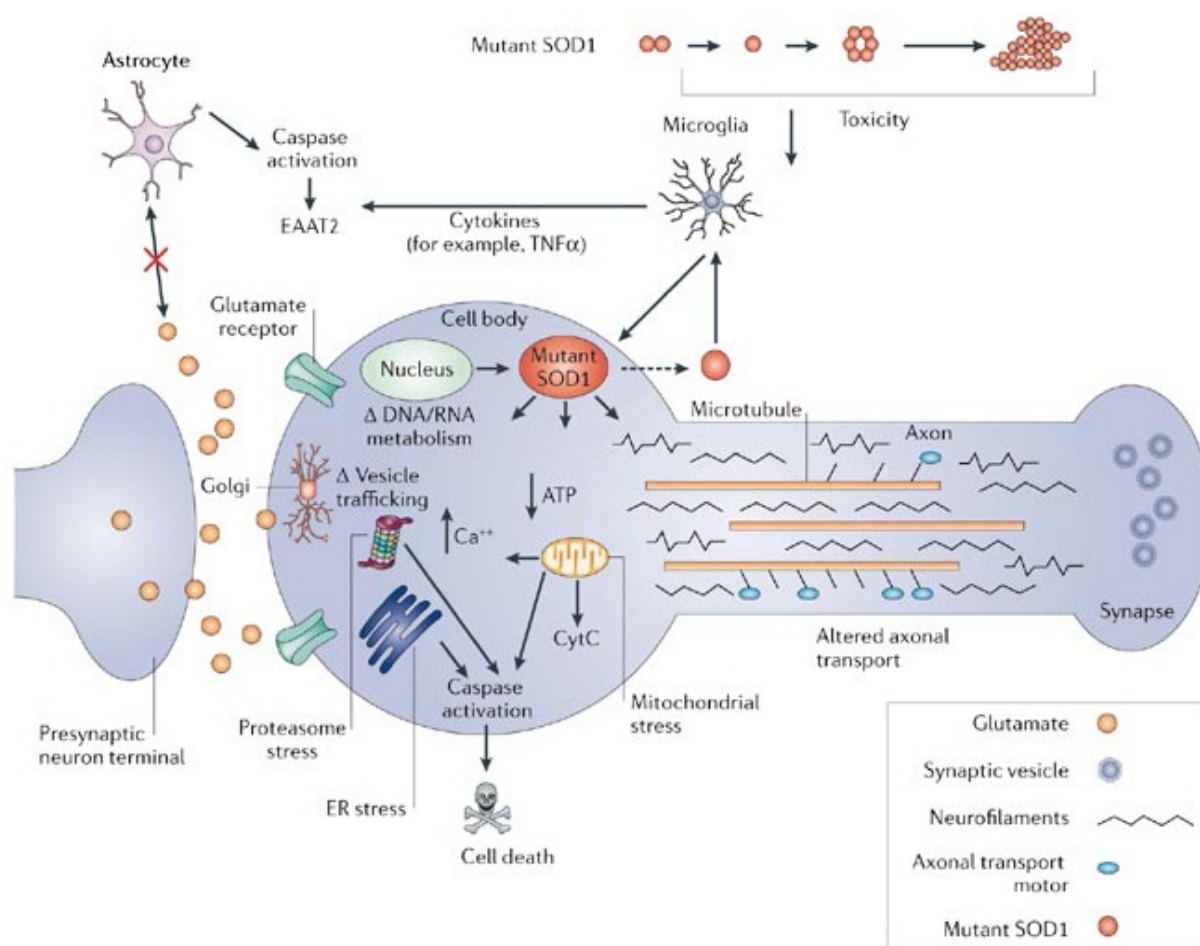


Figure 5: Mécanismes physiopathologiques identifiés dans le modèle SOD1. D'après Pasinelli et al., 2006.

5.2.1 Excitotoxicité, anomalies du calcium et du glutamate

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur au niveau du système nerveux central. Le mécanisme principal de l'excitotoxicité repose sur l'activation excessive des récepteurs au glutamate présents à la surface des neurones, conduisant à une entrée excessive de calcium dans la cellule. Les motoneurones corticaux sont particulièrement vulnérables aux phénomènes d'excitotoxicité médiés par les récepteurs AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid) (Carriedo et al., 1996; King et al., 2007). La mise en évidence d'une élévation du taux de glutamate dans le liquide céphalorachidien chez certains patients atteints de SLA est également venue renforcer l'hypothèse d'un rôle important de l'excitotoxicité glutamatergique (Shaw et al., 1995a; Spreux-Varoquaux et al., 2002). Le riluzole, dont un des effets est d'inhiber le relargage présynaptique du glutamate (Cheah et al., 2010), est la seule molécule à ce jour ayant démontré son efficacité dans le traitement de la

SLA, en augmentant modestement la survie (Lacomblez et al., 1996). D'autres agents anti-glutamate ont également été testés, dont la gabapentine, le topiramate, la lamotrigine et le talampanel, mais aucun n'a démontré d'efficacité (Siciliano et al., 2010).

5.2.2 Anomalies du stress oxydatif

Le stress oxydatif est lié à un déséquilibre entre la production et l'élimination des radicaux libres issus de l'oxygène. De nombreuses données sont en faveur d'un rôle potentiel du stress oxydatif dans la SLA (Ferraiuolo et al., 2011), en particulier la découverte chez des patients atteints de SLA de mutations pathogènes sur le gène SOD1, codant pour une protéine antioxydante majeure. Une élévation marquée des dommages liés au radicaux libres ou de leurs marqueurs a été mise en évidence dans divers échantillons biologiques (incluant sang, urines et liquide céphalorachidien) et dans des tissus postmortem issus de patients atteints de SLA (Shaw et al., 1995b; Smith et al., 1998; Simpson et al., 2004; Mitsumoto et al., 2008). Les sources potentielles du stress oxydant ont été largement investiguées dans le modèle SOD1 où plusieurs réactions oxydatives aberrantes ont été proposées (revues par Barber et collaborateurs en 2010). De nombreuses études montrent que le stress oxydant interagit et potentiellement aggrave les autres processus pathologiques contribuant à la dégénérescence motoneuronale (Ferraiuolo et al., 2011). Une méta-analyse réalisée 2007 à partir des résultats des différentes études effectuées chez la souris SOD classait les thérapeutiques à visée antioxydante comme parmi les plus prometteuses (Benatar, 2007) mais, à ce jour, aucune n'a encore démontré son efficacité chez les patients atteints de SLA.

5.2.3 Dysfonctionnement mitochondrial

La mitochondrie a une place centrale dans de nombreuses voies métaboliques et également dans le déclenchement de l'apoptose. De nombreuses études se sont concentrées sur le rôle des anomalies du fonctionnement mitochondrial dans la SLA (Pasinelli et Brown, 2006). Les arguments en faveur d'un dysfonctionnement mitochondrial dans la SLA sont multiples chez les patients et dans le modèle SOD (Manfredi et Xu, 2005). Ils incluent en particulier la mise en évidence, chez des patients atteints de SLA sporadique, de "clusters" de mitochondries de morphologie anormale au sein des rameaux nerveux (Atsumi, 1981) et des muscles squelettiques (Afifi et al., 1966) associées à des déficits des complexes I et IV de la chaîne respiratoire du muscle (Wiedemann et al., 1998). La signification de ces anomalies, chez des patients souvent atteints de pathologies à un stade avancé, reste d'interprétation difficile. Des

anomalies mitochondriales précoces, avant le début des symptômes moteurs et l'apparition de changements neuropathologiques, ont cependant également été identifiées chez la souris SOD1 (Manfredi et Xu, 2005). Il est également admis qu'une partie de l'enzyme SOD1 mutée est localisée dans la mitochondrie (Higgins et al., 2002), où elle forme des agrégats anormaux, ouvrant de nouveaux champs d'investigation sur la contribution des anomalies mitochondriales à la physiopathologie de la SLA. Cependant, des niveaux très élevés de formes stables de l'enzyme SOD1 humaine (qu'il s'agisse de l'enzyme native ou du variant G93A) peuvent entraîner leur chargement à l'intérieur des mitochondries de souris transgéniques. Les altérations mitochondriales observées dans ce modèle pourraient donc être un artéfact lié au chargement d'une protéine humaine plus qu'un phénomène physiopathologique pertinent chez l'homme (Bergemalm et al., 2006).

5.2.4 Neuroinflammation

De nombreux travaux soulignent le rôle délétère probable de la neuroinflammation dans la pathogénie de la SLA (McGeer et McGeer, 2002). Sur un plan neuropathologique une activation microgliale et une infiltration lymphocytaire sont ainsi objectivées au niveau du système nerveux central (Henkel et al., 2004). Dans les modèles murins SOD, cette activation microgliale est intense et corrèle avec l'évolution de la maladie (Hall et al., 1998; Alexianu et al., 2001). Cette activation microgliale s'accompagne d'une augmentation de médiateurs de l'inflammation comme les cytokines (Elliott, 2001). Ces différents éléments ont conduit à proposer des thérapeutiques à visée anti-inflammatoire, immunomodulatrices ou immunosuppressives (Calvo et al., 2010) sans succès à ce jour.

5.2.5 Apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort programmée déclenché par la cellule en réponse à des signaux qui peuvent être intra- ou extracellulaires. Des marqueurs biochimiques d'apoptose peuvent être détectés au stade terminal de la maladie (Pasinelli et Brown, 2006) chez des patients atteints de SLA et son rôle a également été suggéré sur des données anatomopathologiques (Martin, 1999). Chez la souris mutée SOD1, les multiples perturbations des fonctions cellulaires (Figure 5) s'accompagnent d'une activation des caspases, qui jouent un rôle clé dans la cascade apoptotique chez les mammifères (Pasinelli et Brown, 2006). Ces phénomènes apoptotiques semblent être activés par la voie mitochondriale (Guegan et al., 2001).

5.2.6 Anomalies du transport axonal

La réduction du fonctionnement du transport axonal est aussi une des caractéristiques de la SLA, mise en évidence chez les patients et dans le modèle SOD (Sasaki et Iwata, 1996; Sasaki et al., 2005). Le transport axonal des molécules et organelles est un processus cellulaire fondamental, particulièrement important pour le fonctionnement et la survie des motoneurones du fait de la longueur de leur axone. Les moteurs moléculaires du transport axonal antérograde et rétrograde sont respectivement la kinésine et le complexe dynéine-dynactine. Des mutations sur le gène de la dynactine sont responsables, chez l'homme, d'une forme rare de maladie du motoneurone avec atteinte des cordes vocales (Hafezparast et al., 2003) et les altérations du complexe dynéine-dynactine s'accompagnent d'une dégénérescence progressive des motoneurones chez la souris (LaMonte et al., 2002). La mise en évidence d'une association entre la SLA et certaines mutations sur le gène codant pour la chaîne lourde du neurofilament ou pour la périphérine appuie également l'hypothèse de l'implication des défauts du transport axonal et du cytosquelette dans la physiopathologie de la maladie (Figlewicz et al., 1994; Gros-Louis et al., 2004). Plusieurs éléments indiquent que des perturbations du transport axonal pourraient contribuer à la perte en motoneurones. En particulier, dans plusieurs modèles de souris SOD1, des altérations du transport axonal antérograde (rapide et lent) sont décelables précocement, avant le début des symptômes, et se majorent au cours de la progression de la maladie (Zhang et al., 1997; Borchelt et al., 1998; Williamson et Cleveland, 1999). Le transport axonal rétrograde est également altéré dans le modèle SOD (Murakami et al., 2001). Les mécanismes responsables de ces altérations du transport axonal ne sont pas connus et impliquent probablement différentes voies. Par exemple, le glutamate - impliqué dans les phénomènes d'excitotoxicité - réduit le transport axonal des neurofilaments dans des neurones en culture, via l'activation de protéines kinases qui phosphorylent les protéines neurofilamentaires (Ackerley et al., 2000). L'élévation du TNF (Tumor Necrosis Factor), qui a été mise en évidence chez la souris mutée SOD1, pourrait également jouer rôle en interrompant le fonctionnement de la kinésine (De Vos et al., 2000). Ces anomalies du transport axonal sont vraisemblablement impliquées dans les phénomènes de "dying-back" mis en évidence dans la SLA, au moins dans le modèle SOD (Fischer et al., 2004) (voir "Troisième partie : Altérations de la jonction neuromusculaire dans la SLA").

5.2.7 Agrégats protéiques - dérégulation du métabolisme des ARN

Des agrégats protéiques, sous la forme d'inclusions ubiquitinées compactes ou en "écheveau" présentes dans le cytoplasme des motoneurones, sont un des traits caractéristiques de la neuropathologie de la SLA. L'identification en 2006 de TDP43 comme étant le composant protéique principal de ces inclusions a marqué un tournant dans la compréhension de la physiopathologie de la SLA (Neumann et al., 2006). TDP43 est une ribonucléoprotéine qui peut se lier à l'ADN et à l'ARN. En conditions normales, TDP43 est localisée principalement dans le noyau où elle joue un rôle dans la transcription des gènes, et est également impliquée dans l'épissage alternatif, le transport et la stabilisation des différents ARN. En conditions pathologiques (SLA, DFT avec inclusions ubiquitinées), TDP43 est évacuée du noyau et s'accumule dans le cytoplasme (Chen-Plotkin et al., 2010). L'identification dans des formes familiales de SLA de mutations sur TARDBP, le gène codant pour la protéine TDP43, a confirmé le rôle probablement crucial de cette protéine sur le plan physiopathologique (Sreedharan et al., 2008). L'identification de mutations causales sur le gène codant pour la protéine FUS, également impliquée dans les mécanismes de régulation de la transcription et du traitement des ARN, a apporté une preuve supplémentaire de la place des anomalies du métabolisme des ARN dans la physiopathologie de la SLA.

Des phénomènes toxiques liés à des perturbations du fonctionnement de protéines de liaison à l'ARN par des foyers, ou "foci", de transcrits issus l'expansion intronique GGGGCC sont aussi possiblement associés aux mutations sur le gène C9ORF72 (Gendron et al., 2014). Les patients mutés sur C9ORF72 présentent également une signature neuropathologique particulière, sous la forme d'inclusions neuronales intranucléaires et cytoplasmiques ubiquitine positives mais TDP43 négatives, au niveau de l'hippocampe et du cortex cérébelleux (Al-Sarraj et al., 2011; Al-Chalabi et al., 2012). Ces inclusions TDP43 négatives seraient composées de polypeptides provenant de la traduction non conventionnelle de l'expansion toxique (Mackenzie et al., 2013; Mori et al., 2013).

Enfin, d'autres composants protéiques sont retrouvés dans les agrégats présents au sein des motoneurones. Les inclusions hyalines présentes dans la partie proximale des axones sont ainsi riches en neurofilaments et contiennent de la périphérine (Migheli et al., 1993), et les corps de Bunina incluent cystatine C, transferrine et périphérine (Okamoto et al., 1993; Mizuno et al., 2006; Mizuno et al., 2011). Leur rôle exact dans la physiopathologie de la maladie n'est pas connu.

5.2.8 Anomalies du métabolisme énergétique

Il existe plusieurs arguments en faveur d'une altération du métabolisme énergétique dans la SLA. Une augmentation du métabolisme de base a été démontrée chez certains patients atteints de SLA, touchant jusqu'à la moitié des patients (Desport et al., 2001; Desport et al., 2005). Cet hypermétabolisme apparaît précocement et persiste ensuite tout au long de l'évolution de la maladie (Desport et al., 2005; Bouteloup et al., 2009). Un hypermétabolisme marqué a également été mis en évidence dans un modèle de souris SOD (souris SOD1^{G86R}) associé à une augmentation du métabolisme énergétique musculaire et à une perte des réserves lipidiques de l'organisme. Dans ce modèle murin, l'enrichissement de l'alimentation des souris s'accompagnait d'un allongement marqué de la survie de 20% (Dupuis et al., 2004).

TROISIEME PARTIE : ALTERATIONS DE LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE DANS LA SLA

Les données de la littérature sont en faveur d'altérations précoces de la JNM et de la transmission neuromusculaire (TNM) dans les modèles animaux de SLA. Chez l'homme, des anomalies de la TNM sont mises en évidence chez certains patients atteints de SLA, mais les mécanismes physiopathologiques impliqués ne sont pas connus.

1. Modèles animaux

1.1 Altérations morphologiques précoces des jonctions neuromusculaires dans le modèle SOD

1.1.1 La SLA : une axonopathie distale ?

Fischer et al. ont étudié les modifications morphologiques des JNM survenant au cours du temps chez la souris SOD1^{G93A} (Fischer et al., 2004). Des signes de dénervation des JNM - définis comme l'absence de terminaison nerveuse en regard de la gouttière synaptique - étaient décelables précocement, avant l'apparition d'une baisse des performances motrices. Dès le 47^{ème} jour de vie, environ 40% des JNM visibles étaient dénervées. Une vacuolisation des corps cellulaires des motoneurons n'était mise en évidence qu'au 80^{ème} jour, concomitante avec une baisse des performances motrices au Rotarod. Une diminution du nombre de motoneurons n'était notée, au niveau de la moelle lombaire, qu'à partir du 100^{ème} jour. Ces résultats ont fait évoquer l'hypothèse d'un mécanisme de type "dying-back" à l'origine de la maladie, la SLA s'apparentant pour les auteurs à une axonopathie distale. Dans le même modèle SOD1, Narai et collaborateurs ont également mis en évidence un détachement des terminaisons nerveuses (objectivé par la baisse des jonctions neuromusculaires marquées pour la protéine SV2 présente dans la membrane des vésicules synaptiques, marqueur de la terminaison axonale) au stade présymptomatique (j70) (Narai et al., 2009). A l'inverse, les JNM des muscles extraoculaires, muscles habituellement résistants au processus physiopathologique dans la SLA chez l'homme, semblent épargnées dans le modèle SOD1^{G93A} (Tjust et al., 2012).

1.1.2 Sélectivité initiale de l'atteinte pour les unités motrices de type Fast-Fatigable

L'existence d'une vulnérabilité sélective d'un certain type de motoneurones, ceux générant des axones myélinisés de gros calibre (>5mm), était connue de longue date chez l'homme (Kawamura et al., 1981) comme chez la souris SOD (Wong et al., 1995; Bruijn et al., 1997;). Des résultats récents ont permis de mettre en évidence, dans différents modèles murins de maladie du motoneurone, qu'il s'agit plus précisément d'une vulnérabilité sélective des UM de type FF (Frey et al., 2000; Pun et al., 2006). Frey et al. ont observé au sein du *triceps surae* de la souris SOD1^{G93A} une perte précoce (j50 postnatal, avant le début des symptômes à j90) en synapses neuromusculaires, hautement régionalisée, localisée dans les régions musculaires contenant des fibres de type IIb. Cette perte en synapses de type FF survenait avant la perte en synapses dans les régions contenant des fibres de type IIa (synapses de type FR). Les synapses de type S (dans les régions contenant des fibres de type I) semblaient au contraire particulièrement résistantes à la dénervation. Pun et collègues ont également rapporté des résultats similaires dans le même modèle SOD, après réalisation d'une cartographie de l'innervation des différents compartiments musculaires des pattes arrière. Les axones FF se « déconnectaient » brutalement de leur plaque motrice entre j48 et j50. Un bourgeonnement ("sprouting") des axones des motoneurones FR innervant le même compartiment musculaire était ensuite observé, permettant une réinnervation partielle des JNM de type FF, mais cette réinnervation ne se maintenait pas au cours du temps. Les axones des motoneurones FR se rétractaient à leur tour entre j80 et j90, alors que les motoneurones de type S restaient particulièrement résistants au processus pathologique (Pun et al., 2006). Chez la souris SOD^{G85R}, Pun et collaborateurs retrouvaient des phases de vulnérabilité axonale comparables avec une perte complète en axone de type FF au stade présymptomatique (Pun et al., 2006). Dans ce même modèle murin, Nguyen et collaborateurs ont mis en évidence une perte de 50% environ du nombre de plaques motrices innervées au sein d'un muscle (*epitrochleoanconeus*) essentiellement composé de fibres rapides (>90%). Cette perte en synapses de type rapide n'était cependant objectivable qu'à partir du début de la maladie (Nguyen et al., 2012). Cette divergence peut être en rapport avec des différences intrinsèques entre les différents muscles analysés dans ces 2 études, mais également liée aux différences de stabilité et de propriétés toxiques entre les mutants G93A et G85R. La lignée G85R (lignée 148) présente en effet un phénotype moteur moins rapide avec un début des symptômes très retardé (à 225 jours en moyenne contre 90 jours dans le modèle G93A). Enfin, une étude récente chez la souris SOD1^{G93A} a confirmé la précocité de l'atteinte des JNM des muscles FF en montrant que le

nombre de JNM innervées y était réduit de 40% dès le 30ème jour de vie postnatale, et que cette dénervation précoce s'accompagnait déjà d'une altération des fonctions motrices (Vinsant et al., 2013).

D'autres travaux sont venus apporter des éléments supplémentaires compatibles avec le scénario d'une atteinte précoce et sélective des synapses de type FF. Plusieurs études électrophysiologiques ex-vivo chez le souris $SOD1^{G93A}$ ont ainsi mis en évidence une perte significative en UM au sein des muscles contenant principalement des fibres musculaires rapides, décelable en présymptomatique dès le 40ème jour et atteignant 60% de réduction au 60ème jour (Hegedus et al., 2007; Hegedus et al., 2008). Schaefer et collaborateurs ont également montré chez la souris $SOD1^{G93A}$, après le début des symptômes moteurs, que de nombreux muscles comportaient 2 populations distinctes d'UM : l'une comportant de multiples JNM dénervées ou en cours de dénervation, l'autre constituée d'UM élargies contenant peu ou pas de JNM dénervées. Même s'ils ne permettent pas de faire le parallèle avec un type d'UM donné, ces résultats confirment donc l'existence d'une sous-population motoneuronale survivant même aux stades tardifs de la maladie et compensant partiellement (par bourgeonnement collatéral) la dénervation des plaques motrices (Schaefer et al., 2005).

1.2 Autres modèles animaux de maladie du motoneurone

Plusieurs autres modèles murins de maladie du motoneurone présentent également les caractéristiques d'une axonopathie distale par "dying-back". Ainsi les modèles de souris *pmn* et *MND* se caractérisent par une atteinte précoce des JNM, avant le début des manifestations cliniques, prédominant dans les muscles innervés par les motoneurones de type rapide (Frey et al., 2000). Des anomalies importantes et précoces des JNM sont également mises en évidence dans le modèle *smn* (modèle d'amyotrophie spinale en rapport avec une délétion homozygote du gène de survie du motoneurone 1, SMN1) (Cifuentes-Diaz et al., 2002).

1.3 Etudes électrophysiologiques de la transmission neuromusculaire chez l'animal

Il n'y a que peu d'études électrophysiologiques de la TNM dans des modèles animaux de SLA. Chez la souris $SOD1^{G93A}$, Kennel et collaborateurs ont mis en évidence en ENMG de surface une baisse précoce (dès j47) du nombre d'UM fonctionnelles, mais n'ont pas objectivé d'altération spécifique de la TNM après stimulation nerveuse répétitive (Kennel et al., 1996). Les résultats d'enregistrements ex-vivo de la TNM dans ce modèle animal n'ont été rapportés que récemment (Naumenko et al., 2011; Rocha et al., 2013). Dans l'étude de Naumenko et

collaborateurs, les enregistrements par microélectrodes du diaphragme chez la souris SOD1^{G93A} au début des symptômes moteurs étaient en faveur d'un dysfonctionnement de type présynaptique, avec une probabilité de libération spontanée du neurotransmetteur (fréquence de relargage des ppm) réduite par rapport aux contrôles. A ce stade de la maladie, de nombreuses terminaisons motrices restaient fonctionnelles et les réponses évoquées par la stimulation électrique (amplitude des ppm, contenu quantique) n'étaient pas modifiées significativement. De façon intéressante, ces altérations de type présynaptique étaient plus marquées chez les souris mâles, chez lesquelles une baisse du pool de quanta disponibles pour relargage immédiat était également observée, confirmant le rôle du genre déjà rapporté dans ce modèle (Heiman-Patterson et al., 2005). Cette différence de genre était également notée lorsque les souris mutées SOD1 étaient traitées par facteur de croissance granulocytaire (G-CSF), avec une absence de réponse (clinique ou microélectrophysiologique) au traitement des souris femelles. Dans l'étude de Rocha et collaborateurs, la transmission neuromusculaire était augmentée (augmentation de l'amplitude des ppm et du contenu quantique suggérant une augmentation de l'acétylcholine libérée dans la fente synaptique) au stade présymptomatique. Au stade symptomatique précoce, deux populations de JNMs étaient détectées, l'une conservant un profil d'augmentation de la neurotransmission, l'autre présentant une altération de la transmission synaptique (diminution d'amplitude des ppm et des ppm et augmentation de la durée de la phase ascendante des ppm) (Rocha et al., 2013).

Des enregistrements microélectrophysiologiques ont également été réalisés dans un modèle canin de maladie du motoneurone, l'atrophie musculaire spinale héréditaire du chien. Il s'agit d'une pathologie autosomale dominante phénotypiquement similaire à l'amyotrophie spinale humaine même si moléculairement distincte. Dans ce modèle de maladie du motoneurone, le contenu quantique était diminué alors que la taille des quanta était normale. Ces résultats étaient ici en faveur d'anomalies présynaptiques, avec un déficit de libération de l'ACh (Rich et al., 2002).

1.4 La dimension musculaire de la maladie : le muscle est-il à l'origine d'une déstabilisation de la JNM ?

L'existence d'altérations très précoces des JNM dans la maladie, au moins dans le modèle SOD, a mis en lumière le rôle potentiellement important du muscle dans la pathogénie de la maladie.

1.4.1 L'atteinte des JNM peut-elle être initiée par l'expression de la mutation SOD1 dans le muscle ?

Plusieurs travaux se sont intéressés à la contribution des fibres musculaires exprimant la mutation SOD à la physiopathologie de la maladie (Sugiura et al., 2004; Miller et al., 2006; Carrasco et al., 2010; Wong et Martin, 2010). Les travaux de Sugiura et collaborateurs étudiant les effets d'une transplantation de muscle entre souris sauvage et souris mutée SOD^{G93A} suggéraient un rôle toxique du muscle dans ce modèle (Sugiura et al., 2004). Miller et collaborateurs ont ensuite montré que la diminution de l'expression de la protéine SOD1 mutée dans le muscle n'était pas suffisante à elle seule pour influencer sur l'évolution de la maladie (Miller et al., 2006). Le muscle ne semblait donc pas être la cible initiale de la toxicité du mutant SOD1 dans ce modèle. Cependant, dans cette étude, la baisse du niveau d'expression de la protéine SOD1 mutée était incomplète et concernait un nombre de muscles limité, elle pourrait donc avoir été insuffisante pour modifier la progression de la maladie de façon globale. Enfin, les travaux les plus récents sur ce sujet ont retrouvé des résultats en apparence contradictoires. Carrasco et collaborateurs ont étudié les JNM, deux mois après transplantation croisée de muscle squelettique entre souris sauvage et souris SOD^{G93A}, et démontré que la survenue d'une dégénérescence des JNM était indépendante du génotype SOD1 des fibres musculaires (Carrasco et al., 2010). Wong et Martin ont étudié plusieurs lignées de souris transgéniques exprimant la protéine SOD1 humaine native ou mutée (G37R ou G93A) dans le seul muscle squelettique. Ils ont mis en évidence l'apparition d'un phénotype neurologique et pathologique mais âge-dépendant, beaucoup plus tardif que ce qui est observé lorsque l'expression de la SOD1m concerne les motoneurones. Les premiers symptômes moteurs étaient ainsi détectés vers 8-10 mois. Une perte significative en motoneurones et une dénervation touchant environ 40% des JNM étaient décelables à l'âge de 1 an (Wong et Martin, 2010). Ce mode évolutif plus lent est plus proche de la pathologie humaine, et ces résultats sont venus renforcer l'intérêt porté au rôle du muscle dans la pathogénie de la maladie.

1.4.2 L'expression musculaire de Nogo-A pourrait avoir un rôle toxique sur la jonction neuromusculaire dans la SLA

L'équipe de J.P. Loeffler a montré que l'isoforme Nogo-A de l'inhibiteur de la repousse axonale Nogo (normalement présent au niveau du système nerveux central) est massivement surexprimé dans le muscle squelettique chez la souris SOD^{G86R} (exprimant la mutation murine

G86R, équivalente à la mutation humaine G85R) et chez les patients atteints de SLA (Dupuis et al., 2002). Chez les patients, l'expression musculaire de Nogo-A est limitée aux fibres de type 1 et corrèle avec leur degré d'atrophie ainsi qu'avec la sévérité de l'atteinte motrice clinique (Jokic et al., 2005).

De façon intéressante, la surexpression de Nogo A dans le muscle de souris sauvages entraîne une "déstabilisation" des JNM avec rétraction des terminaisons nerveuses présynaptiques et rétrécissement de la zone postsynaptique (Jokic et al., 2006). A l'inverse, la suppression génétique de Nogo-A s'accompagne d'un allongement de la survie chez la souris mutée SOD (Jokic et al., 2006). Dans ce modèle, des modifications de l'expression musculaire de certains gènes peuvent donc moduler la pathologie.

2. Modifications morphologiques et fonctionnelles de la JNM chez les patients atteints de SLA

2.1 Etudes morphologiques de la JNM

Les études morphologiques de la JNM dans la SLA sont peu nombreuses et ont utilisé essentiellement la microscopie électronique (Bjornskov et al., 1975; Bjornskov et al., 1984; Tsujihata et al., 1984; Siklos et al., 1996; Yoshihara et al., 1998; Liu et al., 2013). Siklos et collaborateurs ont analysé la morphologie des JNM à partir de biopsies musculaires obtenues chez 7 patients atteints de SLA. Dans cette étude, il était mis en évidence une augmentation du volume relatif occupé par les mitochondries au niveau des terminaisons nerveuses, ainsi que de la densité en vésicules synaptiques dans la zone active présynaptique. Le contenu en calcium des terminaisons nerveuses était également augmenté, principalement à l'intérieur des organelles membranaires et en particulier des mitochondries (Siklos et al., 1996). Bjornskov et collaborateurs ont mis en évidence une fragmentation et un élargissement significatif des plaques motrices après marquage des cholinestérases de l'appareil synaptique (Bjornskov et al., 1975). La même équipe a également confirmé par coloration argentique simultanée des terminaisons axonales (coloration de Pestronk et Drachman) l'existence de phénomènes de réinnervation collatérale ("sprouting") (Bjornskov et al., 1984). Dans l'étude de Tsujihata et al., réalisée sur biopsies musculaires de 10 patients atteints de SLA, un peu plus d'un tiers des JNM observées en microscopie électronique étaient totalement dénervées (plaques motrices « dénudées » de leurs terminaisons nerveuses), mais sans anomalie morphologique des régions présynaptiques, en dehors d'une diminution de l'aire occupée par les mitochondries et

de la présence de terminaisons nerveuses de très petite taille au niveau de nombreuses JNM. Le plissement de la membrane postsynaptique était bien préservé, même dans les régions dénudées. La densité en RACH était également normale, y compris au niveau des plaques motrices dénervées (Tsujihata et al., 1984). Ces différents éléments sont également retrouvés dans une étude plus récente analysant les JNM des muscles laryngés prélevés chez des patients atteints de SLA (Yoshihara et al., 1998) : élargissement de certaines plaques motrices, JNM dénudées parfois recouvertes par la cellule de Schwann terminale et présentant un aplatissement de la gouttière synaptique mais avec des plis sous-neuraux toujours relativement bien préservés. Sur une série autopsique, Liu et collaborateurs ont étudié par des immunomarquages, en microscopie confocale, la présence de différentes protéines synaptiques au niveau des JNM des muscles des membres et des muscles extraoculaires. Au sein des muscles extraoculaires, classiquement longtemps épargnés par l'atteinte motrice clinique, les JNM semblaient nettement moins affectées par le processus de dénervation au stade terminal de la maladie (Liu et al., 2013). Plusieurs travaux ont également mis en évidence l'apparition extra-jonctionnelle de RACH dans différentes maladies du motoneurone (Ringel et al., 1976; Uchitel et Dubrovsky, 1986), identique à ce qui est observé lors de lésions expérimentales de dénervation au cours desquelles des RACH de type "fœtal" (contenant la sous-unité γ) sont ré-exprimés sur toute la surface du sarcolemme (Salpeter, 1987). Les caractéristiques physiologiques des RACH ont été étudiées à partir de fractions de membrane musculaire issues de fragments biopsiques prélevés chez des patients atteints de SLA. Les propriétés fonctionnelles des RACH semblent préservées en dehors d'une diminution modérée de la sensibilité à l'ACh, possiblement liée à la coexistence de RACH de type "adulte" (ϵ) et de type "foetal" (γ) au sein des fragments membranaires étudiés (Palma et al., 2011). Enfin, une diminution de l'activité de l'AChE au niveau des JNM de patients atteints de SLA a été objectivée par certains (Fernandez et al., 1986; Yoshihara et al., 1998).

2.2 Enregistrements de la TNM en ENMG de surface

La transmission synaptique au niveau de la JNM peut être étudiée en ENMG de surface, par l'utilisation d'une stimulation nerveuse répétitive (SNR) à basse fréquence (2 à 5 Hz) avec recherche d'un décrétement d'amplitude de la réponse motrice obtenue (généralement mesuré à la 4^{ème} ou 5^{ème} réponse) (AAEM, 2001a). Le seuil de positivité habituellement utilisé, en pratique clinique, pour définir le caractère pathologique du décrétement est de 10% (AAEM, 2001b). Dans la SLA, des anomalies de la TNM en SNR ont été rapportées à plusieurs

reprises (Mulder et al., 1959; Denys et Norris, 1979; Bernstein et Antel, 1981; Killian et al., 1994; Wang et al., 2001; Henderson et al., 2009; Iwanami et al., 2011; Yamashita et al., 2012). La fréquence de mise en évidence d'un décrétement était très variable, de 25 à 83% des patients selon les études. Cette variabilité reflète des différences techniques (fréquence de stimulation, seuil de positivité retenu) et des problèmes méthodologiques, en particulier sur la sélection des patients inclus. Denys et Norris ont ainsi retrouvé un décrétement dans 67% des cas de SLA, mais sans définir de seuil minimal de positivité (Denys et Norris, 1979). Iwanami et collaborateurs ont retrouvé un décrétement supérieur à 5% chez 83% des patients, dans une population de 48 patients présentant une maladie du motoneurone (SLA "suspectée" à "définie" selon la classification de l'El Escorial) (Iwanami et al., 2011). Dans la large série (192 patients) de Killian et collaborateurs, un décrétement supérieur ou égal à 10% était mis en évidence dans seulement 29% des cas (Killian et al., 1994). L'étude des couples nerf-muscle proximaux paraît plus sensible que celle des couples nerf-muscle distaux (Killian et al., 1994; Iwanami et al., 2011) et l'amplitude du décrétement apparaît négativement corrélée avec l'amplitude de la réponse motrice obtenue sur le couple nerf-muscle correspondant (Henderson et al., 2009; Yamashita et al., 2012). Au sein des muscles distaux de la main, un décrétement semble plus fréquemment mis en évidence dans le territoire médian que dans le territoire cubital (Henderson et al., 2009; Yamashita et al., 2012). Les muscles faciaux peuvent également être concernés, en particulier dans les formes bulbaires de la maladie (Kim et al., 2011). Les caractéristiques cliniques du sous-groupe de patients présentant un décrétement ne sont pas clairement définies. Certaines études ont retrouvé une corrélation entre le décrétement et l'atrophie musculaire (Mulder et al., 1959; Denys et Norris, 1979), d'autres avec la rapidité d'évolution (Bernstein et Antel, 1981). Dans l'étude de Wang et collaborateurs portant sur 15 patients, l'importance du décrétement était ainsi corrélée avec la chute des amplitudes motrices à 1 an, mais pas avec la perte en UM (Wang et al., 2001). Les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent ces anomalies électrophysiologiques ne sont pas connus. Plusieurs hypothèses ont été évoquées, comme des altérations de type présynaptique, en rapport avec un dysfonctionnement des canaux ioniques des axones en cours de dégénérescence (Bostock et al., 1995). Ces modifications de TNM pourraient également être liées aux phénomènes de réinnervation collatérale, du fait de la myélinisation incomplète des branches des axones moteurs immatures aux stades précoces de la réinnervation (Wang et al., 2001).

2.3 Enregistrements microélectrophysiologiques de la TNM

Il n'existe que 2 études microélectrophysiologiques portant sur les altérations fonctionnelles de la JNM, dans la SLA, chez l'homme (Highstone et al., 1975; Maselli et al., 1993). Highstone et collaborateurs ont étudié la TNM par des enregistrements microélectrophysiologiques sur des biopsies de muscles intercostaux, chez 15 patients atteints de SLA (Highstone et al., 1975). Ils ont mis en évidence une plus grande variabilité de l'amplitude des ppmm associée à une plus grande proportion de ppmm de grande amplitude. Ces anomalies sont compatibles avec une variabilité anormale de la taille des vésicules synaptiques libérées par les terminaisons nerveuses (anomalie de type présynaptique). Des altérations structurelles du versant postsynaptique s'associant à un défaut d'uniformité de la sensibilité à l'ACh de la plaque motrice (fragmentation marquée par exemple) pourraient également s'accompagner de modifications microélectrophysiologiques de ce type. Maselli et collaborateurs ont étudié la TNM sur biopsies de muscle anconé chez 10 patients présentant une SLA (Maselli et al., 1993). Quatre patients sur 10 présentaient un décrétement d'amplitude significatif (défini ici comme supérieur à 7%, mesuré à la 4^{ème} réponse) en ENMG de surface (SNR à basse fréquence réalisée sur le nerf médian ou le nerf cubital du même membre que le muscle biopsié). L'analyse morphométrique des fibres musculaires retrouvait des lésions de dénervation (groupes de fibres atrophiées) chez tous les patients. Des JNM dénervées (absence de terminaison nerveuse en regard de la membrane musculaire postsynaptique) étaient visibles en microscopie électronique chez tous les patients. La plupart des JNM encore innervées étaient considérées comme morphologiquement normales, d'autres présentant une terminaison nerveuse de taille anormalement petite par rapport à la membrane postsynaptique en regard. En particulier, aucune réduction ou variabilité excessive de la taille des vésicules synaptiques n'était notée. Les enregistrements électrophysiologiques par microélectrode mettaient en évidence une diminution de l'amplitude moyenne des ppmm chez les patients atteints de SLA, associée à une variabilité accrue d'amplitude. En revanche, la fréquence des ppmm était très variable d'un patient à l'autre, sans différence objectivable entre la fréquence moyenne des patients et celle des sujets contrôles. Le contenu quantique moyen des ppm, le pool moyen de quanta disponibles pour libération immédiate et le stock quantique étaient diminués. A l'inverse, la probabilité moyenne de libération quantique était normale et la probabilité moyenne de libération du stock quantique était augmentée au niveau de la plupart des JNM enregistrées. Ces résultats étaient en faveur d'altérations de type présynaptique au niveau des JNM des patients SLA, associant une inadéquation apparente entre le nombre de

vésicules localisées aux sites de libération (bas) et la probabilité, relativement haute, de libération d'une vésicule synaptique après un potentiel d'action. A partir de ces résultats, plusieurs mécanismes pouvaient être évoqués comme une dépolarisation trop prolongée de la terminaison motrice (par blocage des canaux potassiques), une diminution de la capacité à tamponner le calcium au niveau de la terminaison nerveuse ou encore une augmentation de l'entrée de calcium dans les terminaisons nerveuses.

3. Synthèse et objectifs du travail de thèse

Certains patients atteints de SLA présentent donc des altérations de la TNM, objectivables lors des tests en SNR en ENMG de surface, mais les modifications morphologiques correspondantes des JNM n'ont jamais été caractérisées. Les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent ces altérations de la TNM sont également à identifier. Les résultats rapportés dans différents modèles animaux de SLA suggèrent que ces phénomènes pourraient jouer un rôle clé dans le processus pathologique. L'objectif de mon travail de thèse était donc de réaliser une caractérisation morphologique complète de la JNM dans la SLA afin de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie chez l'homme et éventuellement d'isoler de nouvelles cibles accessibles à des traitements potentiels.

X. PATIENTS ET METHODES

1. Patients et témoins

Entre mars 2009 et avril 2011, douze patients âgés de plus de 18 ans et présentant une SLA définie, probable, probable sur des arguments paracliniques, ou possible selon les critères révisés de l'El Escorial (Brooks et al., 2000) ont été recrutés au sein du centre SLA de Paris (Hôpital de la Pitié-Salpêtrière). Tous les patients ont donné leur consentement éclairé par écrit à la réalisation de l'étude. Une patiente présentant une positivité des anticorps (Ac) anti-canaux calciques voltage-dépendants (pouvant potentiellement influencer sur la transmission neuromusculaire) a été secondairement exclue de l'étude. Parmi les 11 patients restants, 6 ont été inclus en début d'évolution (moins de 18 mois après le début des symptômes moteurs) et suivis jusqu'au décès ou la mise en route d'une ventilation assistée. Les 5 autres patients ont été inclus plus de 5 ans après le début des symptômes moteurs et pouvaient donc être considérés comme des "survivants à long terme" ("long-term survivors" des anglo-saxons) définis comme des patients présentant une survie supérieure à 5 ans après le début des symptômes, en l'absence de ventilation invasive par trachéotomie (Mateen et al., 2010).

Six échantillons de muscle histochimiquement normaux ont été utilisés comme contrôles pour les analyses morphométriques musculaires et l'analyse en RT-qPCR (Reverse Transcription quantitative real-time Polymerase Chain Reaction). Il s'agissait de spécimens musculaires issus de biopsies de muscle deltoïde réalisées chez des sujets initialement explorés pour suspicion de maladie musculaire devant des symptômes aspécifiques (fatigue et/ou douleur) et finalement considérés comme indemnes de toute pathologie neuromusculaire après revue de l'ensemble des résultats des examens complémentaires.

2. Evaluation des patients

2.1 Clinique

Les principales données démographiques ont été recueillies à l'interrogatoire : antécédents personnels et familiaux, date et lieu (bulbaire ou spinal) de début de la maladie, traitements en cours. Tous les patients ont été suivis cliniquement tous les 3 mois. Le retentissement fonctionnel de la maladie a été évalué par l'échelle ALSFRS-R comportant 12 items, chacun gradué de 4 (fonction normale) à 0 (perte totale de fonction), réalisant une cotation de 0 à 48. La force des différents groupes musculaires a été évaluée par un testing musculaire manuel

selon la cotation du Medical Research Council (cotation de 0 représentant la paralysie complète du muscle testé, à 5 correspondant à une force normale).

2.2 Biologique

La recherche d'anticorps (Ac) potentiellement impliqués dans un dysfonctionnement de la transmission neuromusculaire a été réalisée chez tous les patients : Ac anti-RACH, Ac anti-canaux calciques voltages dépendants et Ac anti-MuSK.

2.3 Analyses génétiques

Lorsque l'accord du patient pouvait être obtenu, une étude génétique était réalisée pour la recherche d'une mutation causale sur les gènes les plus souvent impliqués dans les formes familiales de SLA : SOD1, TARDBP, FUS et C9ORF72 (C. Cazeneuve, U.F. de Neurogénétique Moléculaire et Cellulaire, Hôpital de la Salpêtrière; S. Millecamps, Génétique des affections du système nerveux périphérique et de l'épilepsie, CRICM, Hôpital de la Salpêtrière). Chez certains patients, l'analyse génétique a été complétée, au cas par cas et en fonction du phénotype clinique, par la recherche de mutations plus rarement associées à la survenue de la maladie (mutations sur les gènes VCP, UBQLN2, ANG et ATXN2).

3. Analyse de la transmission neuromusculaire en ENMG de surface

Deux explorations ENMG ont été réalisées dans le cadre de l'étude : à l'inclusion et après 3 mois d'évolution. L'évaluation ENMG comprenait 2 parties : étude de la TNM en SNR à basse fréquence et au cours d'un test d'effort maximal bref.

3.1 Stimulation nerveuse répétitive à basse fréquence

Une SNR à basse fréquence (train de 10 chocs à 3Hz) était effectuée sur les couples nerf-muscle suivants de façon bilatérale : nerf spinal-trapèze, nerf cubital-hypothenarien, nerf radial-anconé, nerf sciatique poplité externe (SPE)-jambier antérieur, et couple V-VII – complexe mentonnier. Le seuil de significativité retenu pour le décrétement était une baisse d'amplitude motrice d'au moins 10% entre la 1^{ère} et la 5^{ème} réponse.

3.2 Test d'effort maximal bref

Un test d'effort maximal bref (30 secondes) était réalisé sur les muscles suivants : muscles hypothenariens et stimulation du nerf cubital, muscles plantaires internes et stimulation du

nerf sciatique poplitée interne. Une augmentation de l'amplitude motrice distale supérieure à 20% juste après la fin de l'effort (facilitation post-exercice) était considérée comme significative.

4. Analyse morphologique de la JNM sur biopsie de muscle

4.1 Prélèvement musculaire

Une biopsie musculaire était réalisée, après l'évaluation clinique initiale, chez tous les patients inclus. Les échantillons musculaires ont été prélevés chez 8 patients au niveau du muscle deltoïde par une biopsie chirurgicale, réalisée sous anesthésie locale. La région des JNM était déterminée par la visualisation d'une petite secousse musculaire provoquée par le contact de la pointe du scalpel à la surface des faisceaux musculaires. Chez 3 patients, les échantillons musculaires ont été obtenus par biopsie chirurgicale du muscle anconé effectuée sous anesthésie loco-régionale selon la technique décrite par Maselli et collaborateurs (Maselli et al., 1991).

4.2 Etude morphologique de la JNM

Immédiatement après la réalisation de la biopsie, la présence de JNM était confirmée sur une bande longitudinale de muscle en utilisant la méthode classique de Koelle révélant l'activité des cholinestérases (Koelle et Friedenwald, 1949).

4.2.1 Etude topographique de la JNM

L'organisation topographique de la JNM a été étudiée en microscopie confocale à balayage laser sur échantillon biopsique de grande taille (0,5 X 0,5 X 5mm). Après fixation au paraformaldéhyde 4%, les fragments musculaires étaient marqués pour les RACH avec de l' α -bungarotoxine (α -BGT) couplée à de la rhodamine (1/500, tétraméthylrhodamine α -bungarotoxine, Molecular Probes, Invitrogen, Saint Aubin, France), et pour les neurofilaments par des anticorps spécifiques. Comme les différents types de neurofilaments peuvent être exprimés à des temps différents au cours du processus de réinnervation et en fonction de la taille de l'axone en croissance (Donahue et al., 1988), les immunomarquages ont été réalisés pour chaque patient pour les trois principales sous-unités neurofilamentaires, sur différents fragments de muscle. Les Ac primaires suivants ont été utilisés : Ac anti-neurofilament 168kDa (1/250, 2H3, Hybridoma Bank, Iowa City, Iowa), Ac anti-neurofilament 200 kDa

(1/250, Chemicon, Billerica, Massachusetts) et Ac anti-neurofilament 68 kDa (1/100, Abcam, Cambridge, Massachusetts). La cellule de Schwann terminale était marquée par un Ac dirigé contre la protéine S100 (1/50, Polyclonal Rabbit S100, Dako, Les Ulis, France). L'AChE présente dans la lame basale synaptique était révélée par la fasciculine biotinylée (inhibiteur spécifique de l'AChE, donnée gracieusement par le Dr Eric Krejci, Centre d'Etude de la Sensori-Motricité, CNRS-UMR8194, Université Paris Descartes, France), suivie secondairement par de la streptavidine couplée à un fluorochrome. La BChE était marquée par un Ac spécifique également donné par le Dr Eric Krejci (Hrabovska et al., 2010). Les échantillons ont été observés au microscope confocal (Carl Zeiss LSM510, Oberkochen, Allemagne).

4.2.2 Etude ultrastructurale de la JNM

Les échantillons dédiés à l'étude ultrastructurale des JNM ont été fixés dans un mélange de paraformaldéhyde à 2 % et de glutaraldéhyde 2,5 % en solution dans du tampon phosphate (0,12 M; pH 7,4). Après rinçage et post-fixation dans un tampon composé de tétroxyde d'Osmium (2 %) et de cacodylate de sodium, les échantillons ont été déshydratés dans des bains croissants d'éthanol puis inclus en résine Epoxy. Les blocs de résine ont été coupés au moyen d'un ultramicrotome UCT (Leica) en coupes semi-fines et ultra-fines :

- les coupes semi-fines (0,5 µm d'épaisseur) ont été colorées à chaud au bleu de toluidine à 1%, puis examinées au microscope optique afin de repérer l'emplacement des JNM;
- les coupes ultra-fines (80 nm d'épaisseur) ont été recueillies sur des grilles support en nickel (200 mesh) puis contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb de Reynolds. Ces coupes ont été examinées au microscope électronique (CM120, Philips) et photographiées au moyen d'une caméra numérique à haute résolution (Morada).

Différents paramètres ont été évalués au niveau des 3 compartiments de la JNM : structure et taille des régions postsynaptiques, présence de régions postsynaptiques dénudées (dénervation), changements dégénératifs au niveau des plaques motrices, taille et nombre des profil axonaux (terminaisons nerveuses) et morphologie de la cellule de Schwann terminale.

5. Analyse des gènes musculaires potentiellement impliqués dans le processus de réinnervation

Le niveau d'expression des différents gènes candidats impliqués dans le processus de réinnervation a été déterminé par RT-qPCR (T. Simonet, équipe du Dr L. Schaeffer,

UMR5239, Ecole Normale Supérieure, Lyon, France). Après homogénéisation des tissus (FastPrep ® -24 Instrument, MPbiomedicals, Santa Ana, Californie), l'ARN total était isolé dans 750 µl de réactif TRI-Reagent (Sigma-Aldrich # T9424, St Louis, Missouri) selon les instructions du fabricant, excepté qu'une seconde précipitation à l'isopropanol était effectuée. La transcription inverse des ARNm était effectuée sur 1 µg d'échantillon d'ARN en utilisant la transcriptase inverse RevertAid H Minus (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, Villebon sur Yvette, France). La PCR quantitative en temps réel était réalisée deux fois en deux exemplaires à l'aide du kit PCR SYBR Green Rotor-Gene (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les gènes qui ont été utilisés pour la normalisation sont la β -2-microglobuline, l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 et la β -actine. Les séquences des amorces utilisées sont détaillées Annexe 1.

6. Analyse morphométrique et histochimique des fibres musculaires

L'analyse morphométrique des fibres musculaires a été réalisée sur les échantillons de muscle deltoïde, sur coupes au cryostat après coloration de l'activité ATPasique de la myosine à pH 9,4 suivant la méthode proposée par Brooke et Kaiser (Brooke et Kaiser, 1969). Le diamètre moyen des fibres musculaires et le pourcentage de fibres de type I et de type II ont été déterminés. Environ 400 fibres musculaires ont été analysées par échantillon, par la mesure de toutes les fibres musculaires de quatre champs adjacents indépendants. Les coupes ont été observées à l'aide d'un microscope Zeiss Axioplan couplé à une caméra Zeiss AxioCam HRc. Les images réalisées ont été traitées avec le logiciel Axio Vision 4.4 (Zeiss, Allemagne). Pour chaque type de fibres, les fibres atrophiques ont été définies comme ayant un diamètre inférieur à 2 déviations standard au dessous du diamètre moyen des fibres du même type mesuré chez les sujets témoins.

7. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée pour partie avec le logiciel XLSTATS 2012 (Addinsoft, Paris, France) et pour partie à l'Unité de Recherche Clinique de la Salpêtrière (M.L. Tanguy, service du Pr Mallet) avec le logiciel SAS version 8.2 (SAS Institute, Cary, Caroline du Nord). Pour l'analyse des données démographiques et cliniques, le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour les données continues et le test exact de Fisher pour les données catégorielles. Pour les analyses en ENMG de surface, la comparaison entre les deux groupes des amplitudes moyennes initiales de chaque nerf a été réalisée au moyen du test non

paramétrique de Mann-Whitney. La fréquence de survenue d'un décrement significatif a été comparée entre les deux groupes à l'aide d'un modèle linéaire généralisé mixte pour données corrélées (la fonction de lien utilisée étant la fonction Logit). L'existence de corrélations entre la variation d'amplitude de la réponse motrice en SNR et l'amplitude motrice de repos a été recherchée au moyen d'un modèle linéaire mixte pour données corrélées. Afin de tester l'association entre les caractéristiques morphologiques des JNM et le groupe de patients (SLA d'évolution rapide versus "survivants à long-terme"), nous avons utilisé un modèle de régression logistique mixte avec effet patient aléatoire (analyse quantitative globale de l'innervation), un modèle linéaire mixte pour données corrélées (analyse qualitative de l'innervation et de la cellule de Schwann terminale) et un modèle linéaire généralisé mixte pour données corrélées, la fonction de lien utilisée étant la fonction Logit (morphologie du compartiment postsynaptique). Les corrélations entre les données cliniques, électrophysiologiques et morphologiques ont été analysées par le test des rangs de Spearman. Tous les tests statistiques ont été réalisés de façon bilatérale et le niveau de signification a été fixé à $P = 0,05$.

XI. RESULTATS

ANALYSE MORPHOLOGIQUE ET FONCTIONNELLE DES JNM DANS LA SLA

1. Données cliniques

Douze patients atteints de SLA, âgés de 36 à 63 ans, ont été inclus dans notre étude. Tous étaient sous traitement par riluzole. Une patiente présentait, lors de l'évaluation initiale, une positivité des Ac anti-canaux calciques voltage-dépendants de type P/Q à un taux supérieur à 100 pM. Cette patiente a été exclue de l'étude avant réalisation de la biopsie musculaire. Parmi les onze patients restants (Tableaux 8 et 9), six patients (groupe 1, SLA d'évolution rapide) ont été inclus en début d'évolution (moins de 18 mois après le début des symptômes moteurs). La durée médiane d'évolution de la maladie au moment de la biopsie était ainsi de 11 mois [9-18] dans le groupe 1. Tous les patients de ce groupe ont présenté une aggravation rapide de leur fonction motrice et ont été suivis jusqu'au décès ou la mise en route d'une ventilation assistée. La durée moyenne de suivi dans ce groupe a été de 20 mois [1-39]. A la fin de l'étude, 5/6 patients du groupe 1 étaient décédés (durée moyenne de la maladie = 31 mois), et 1/6 avait recours à une ventilation assistée (ventilation par BiPAP).

Tableau 8 : Caractéristiques cliniques des 11 patients

Patient	Age	Sexe (H/F)	Site de début de la maladie	Durée d'évolution de la maladie au moment de la biopsie musculaire (m)	Durée du suivi après biopsie (m)	Décédé à la fin de l'étude (O/N)	
1*	63	F	Spinal	10	39	O	Groupe 1 : SLA d'évolution rapide
2	50	H	Spinal	12	1	O	
3	60	F	Bulbaire	9	16	O	
4	48	F	Spinal	9	34	O	
5	63	H	Spinal	18	19	N [◇]	
6	56	H	Bulbaire	14	13	O	
7	53	H	Spinal	193	6	N	Groupe 2 : SLA d'évolution lente
8	36	F	Spinal	85	16	N	
9	52	H	Spinal	101	18	N	
10	55	H	Spinal	72	13	N	
11**	55	F	Spinal	100	14	N	

* Expansion de taille intermédiaire (31 répétitions) sur le gène ATXN2

** Mutation sur le gène SOD1 (c.418A>G, nomenclature de l'ALS online database : N139D)

◇ Ventilation non invasive (BiPAP)

Tableau 9: Caractéristiques cliniques et démographiques des 2 groupes de patients

	Groupe 1 SLA d'évolution rapide (n=6)	Groupe 2 SLA d'évolution lente (n=5)	Statistiques
Age	56,7 [48 – 63]	50,2 [36 – 55]	NS
Sexe ratio (H/F)	3/6	3/5	NS
Age de début	55,3 [47 – 62]	41,4 [29 – 50]	<i>P</i> =0,022
Forme bulbaire, no. (%)	2 (33,3)	0 (0,0)	NS
ALSFRS-R	38,2 [30 – 46]	36,2 [32 – 41]	NS
Testing musculaire [§]	4,5 [2 – 5]	4,0 [2 – 5]	NS
Durée du suivi après la biopsie (m)	20 [1 – 39]	13 [6 – 18]	NS
Durée d'évolution moyenne au moment de la biopsie (m)	11 [9 – 18]	100 [72 – 193]	<i>P</i> =0,004
Taux de progression global de l'atteinte fonctionnelle motrice (unités/mois)*	1,271 [0,398 – 2,656]	0,115 [0,076 – 0,167]	<i>P</i> =0,004
Taux de progression durant le suivi post-biopsie (unités/mois)**	3,018 [0,584 – 9,130]	-0,001 [-0,180 – 0,222]	<i>P</i> =0,004
Décès à la fin de l'étude :			
<i>n</i>	5/6	0/5	
Durée de la maladie (m)	31 [13 – 49]	NA	NA

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne [valeurs extrêmes], sauf spécification contraire.

ALSFRS-R : ALS Functional Rating Scale-Revised. NA : non applicable.

NS : non significatif. s.e. : standard error.

[§]Cotation MRC à l'inclusion pour le muscle biopsié (abduction du bras pour le muscle deltoïde, extension du coude pour le muscle anconé)

*Taux de progression globale de l'atteinte fonctionnelle motrice =

(48 - score ALSFRS-R au dernier suivi)/durée d'évolution entre le début des symptômes et le dernier suivi

**Taux de progression de l'atteinte fonctionnelle motrice durant le suivi post-biopsie =

(score ALSFRS-R au moment de l'inclusion - score ALSFRS-R au dernier suivi)/durée du suivi

Les 5 autres patients (groupe 2, SLA d'évolution lente ou "survivants à long-terme") ont été inclus dans l'étude plus de 5 ans après le début des symptômes moteurs. La durée médiane d'évolution de la maladie dans ce groupe au moment de la biopsie était de 100 mois [72-193]. Il s'agissait de patients présentant une évolution lente avec une survie prolongée ("long-term survivors" des anglo-saxons (Mateen et al., 2010), mais aussi une atteinte fonctionnelle motrice modérée (en particulier absence de recours à une ventilation assistée, ou à une gastrostomie d'alimentation). La durée moyenne de suivi dans le groupe 2 a été de 13 mois [6-18]. L'âge de début de la maladie était significativement plus précoce dans ce dernier groupe ($P = 0,022$). Les autres données démographiques étaient similaires dans les deux groupes.

Chez le patient n°11 (groupe 2) qui rapportait des antécédents familiaux de SLA chez un parent au premier degré, nous avons identifié une mutation sur l'exon 5 du gène SOD1 (c.418A> G, numérotation selon la base de données en ligne de la SLA : N139D). Chez le patient n°1 (groupe 1), une expansion de taille intermédiaire (31 répétitions) sur le gène ATXN2 a été mise en évidence, expansion pouvant être considérée comme un facteur de risque de SLA sporadique.

L'atteinte fonctionnelle motrice à l'inclusion (score ALSFRS-R, testing musculaire) était modérée et similaire dans les 2 groupes de patients. Le taux de progression de la maladie au cours du suivi après la biopsie (suivi au cours de l'étude) a été calculé comme suit :

Taux de progression de l'atteinte fonctionnelle motrice durant le suivi post-biopsie =
(score ALSFRS-R au moment de l'inclusion - score ALSFRS-R au dernier suivi)/durée du suivi

Le taux de progression moyen de la maladie au cours du suivi a été de 3,018 unités/mois (0,584 à 9,130) dans le groupe 1 et -0,001 unités/mois (-0,180 à 0,222) dans le groupe 2 ($P = 0,004$). Les patients du groupe 2 n'ont montré pratiquement aucun déclin fonctionnel au cours du suivi, le taux de progression moyen de la maladie discrètement négatif dans ce groupe reflétant des fluctuations quotidiennes de la fonction motrice (fatigue, spasticité).

2. Etude de la transmission neuromusculaire en ENMG de surface

2.1 Stimulation nerveuse répétitive à 3Hz

2.1.1 Principes d'analyse

La SNR à basse fréquence permet de rechercher une altération de la TNM, sans préjuger de son origine pré- ou postsynaptique (Fournier, 1998). Entre 2 stimulations nerveuses, le renouvellement de la quantité normale d'ACh disponible nécessite environ 1 seconde. La stimulation du nerf à une fréquence supérieure à 1Hz (on utilise généralement 10 stimulations à une fréquence de 3Hz) s'accompagne donc d'une baisse progressive de la quantité d'ACh libérée et d'une baisse d'amplitude du ppm. Chez le sujet sain, la marge de sécurité de la TNM est suffisamment importante pour que l'amplitude du ppm reste supérieure au seuil de genèse du potentiel d'action musculaire. En cas d'atteinte de la TNM, la baisse progressive, au fur et à mesure de la répétition des stimulations, de la quantité d'ACh libérée va s'accompagner d'une diminution de l'amplitude du ppm, certains ppm n'étant plus suffisants pour générer un potentiel d'action musculaire. Cela se traduit par une baisse de l'amplitude et de la surface de la réponse motrice recueillie : le décrétement, considéré comme significatif d'une altération de la TNM en pratique clinique lorsque son amplitude atteint 10%.

2.1.2 Résultats

Un décrétement supérieur ou égal à 10% était retrouvé, sur au moins un nerf, chez 45% des patients (5/11, 8 nerfs) lors de l'évaluation initiale (M0) et 33% des patients (3/9, 3 nerfs) lors de l'évaluation au 3ème mois (M3). Le décrétement était en moyenne de 18% [11–26] pour les 11 nerfs concernés (Tableaux 10, 11 et 12). Il était enregistré sur le nerf radial dans 5 cas sur 11, le nerf SPE dans 4 cas, plus rarement sur le nerf spinal (1 cas) ou au niveau facial (couple V-XII, 1 cas). L'analyse de l'ensemble des nerfs présentant réponse décrémentale en SNR retrouvait une corrélation négative significative ($p=0,01$) entre l'amplitude du décrétement et l'amplitude motrice mesurée au repos sur le nerf concerné : le décrétement mesuré était d'autant plus grand que l'amplitude motrice de départ était faible. Cette corrélation n'était pas retrouvée lorsque l'analyse se limitait aux seuls nerfs présentant un décrétement "significatif" ($\geq 10\%$). Aucune corrélation n'était retrouvée entre l'amplitude du décrétement à M0 et la durée d'évolution de la maladie, la valeur du score ALSFRS-R à M0 ou le taux de progression de l'atteinte motrice au cours du suivi.

Evolution entre M0 et M3

Parmi les 5 patients présentant un décrétement $\geq 10\%$ à M0, trois ont bénéficié d'une deuxième évaluation. Pour 2 d'entre eux, le décrétement observé initialement persistait à M3. Son amplitude diminuait (de -26 à -19%) pour un patient et augmentait légèrement pour l'autre (de -18 à -21%). La médiane de variation du décrétement entre M0 et M3 était de 6%. La présence d'un décrétement significatif n'était pas corrélée avec une baisse de l'amplitude distale motrice entre M0 et M3, sur le même nerf.

Tableau 10 : Résultats de l'étude en SNR pour le nerf cubital et le nerf radial

	Nerf cubital D				Nerf cubital G				Nerf radial D				Nerf radial G			
	M0		M3		M0		M3		M0		M3		M0		M3	
Patient	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR
1	8,7	0	14,7	2	7,7	0	10,4	4	3	0	9	2	3,6	0	NR	
2*	9,8	2	NR		12,2	-4	NR		3,9	-16	NR		1,2	-16	NR	
3	14,1	1	14,7	1	9,9	-1	7,8	-3	9,4	0	7,4	-1	6	5	NR	
4	6,3	-3	4,1	-1			3,3	2	5,5	-2	5,7	-3	2,3	-9	2,5	-7
5	13,8	0	11,3	1	11,3	0	9,9	0	5,5	-1	7	0	10	6	8,3	3
6	6,9	2	4,4	-9	12,3	2	9,6	-1	12,1	-1	8,1	-5	9,4	2	6,3	1
7	11,7	1	10,8	0	1,9	-2	1,1	-7	11,7	6	11,2	4	11,5	5	11,1	3
8	4,4	1	3,8	3	6,2	4	5,8	1	0,9	-2	0,4	-5	1,9	-26	3	-19
9	8,8	-4	8,9	-4	3,5	-3	3,4	-9	0		0		0,7	-3	0,3	
10	15,8	-1	15,5	1	9,3	0	9,2	2	4,7	0	4,7	5	3,9	-4	6,1	-1
11**	8,4	-2	NR		11,7	0	NR		5,1	-25	NR		3,2	-4	NR	

Groupe 1 (SLA d'évolution rapide) : patients 1 à 6.

Groupe 2 (SLA d'évolution lente, "survivants à long-terme") : patients 7 à 11.

M0 : évaluation initiale, avant la biopsie

M3 : évaluation au cours du suivi à 3 mois

Amp. : Amplitude distale motrice (mV). Stimulation nerveuse répétitive (SNR) : variation d'amplitude mesurée à la 5^{ème} stimulation (%). NR : non réalisé.

* Patient décédé avant l'évaluation à M3, ** Patient ayant refusé l'évaluation à M3.

**Tableau 11 : Résultats de l'étude en SNR pour le nerf spinal
et la face (couple V-XII)**

Patient	Nerf spinal D				Nerf spinal G				Couple V-XII D				Couple V-XII G			
	M0		M3		M0		M3		M0		M3		M0		M3	
	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR
1	6	-6	7,6	-1	4,7	0	8,3	-3	1,7	1	2,9	-1	1,5	1	3,3	4
2*	9,1	-8	NR		8,5	-3	NR		7,2	1	NR		5,9	-2	NR	
3	7,8	1	9,3	-2	7,3	-1	6	-4	4,3	-6	2,3	4	2,5	-7	1,8	-12
4	10,9	-2	12,2	6	10,9	-3	8,3	3	2,8	7	5,6	-8	5	1	4,3	-4
5	12,8	1	11,4	1	10,2	0	9	-3	5,3	1	7,64	2	5,2	4	4,7	2
6	12,4	0	11,4	-3	9,3	2	8,9	2	2	3	3,34	-4	1,9	2	2,4	5
7	12,1	-3	11,3	-1	14,1	-6	12,8	-4	3	1	5,9	0	3,3	-3	8	0
8	9,1	-3	7,1	-3	9,4	5	9,5	6	1,4	0	4,3	2	1,5	3	4,3	0
9	8,4	-1	9,6	1	9,5	-3	9,8	1	2,4	2	3,9	3	5,2	10	3,6	3
10	6,3	-11	6,2	-5	5,6	0	4,9	-2	4,3	0	3,2	3	3,7	6	2,4	3
11**	12	-1	NR		10,8	-1	NR		4,4	1	NR		5,1	2	NR	

Groupe 1 (SLA d'évolution rapide) : patients 1 à 6, groupe 2 (SLA d'évolution lente, ("survivants à long-terme")) : patients 7 à 11. M0 : évaluation initiale, avant la biopsie; M3 : évaluation au cours du suivi à 3 mois. Amp. : Amplitude distale motrice (mV). Stimulation nerveuse répétitive (SNR) : variation d'amplitude mesurée à la 5ème stimulation (%). NR : non réalisé.

* Patient décédé avant l'évaluation à M3, ** Patient ayant refusé l'évaluation à M3.

**Tableau 12: Résultats de l'étude en SNR pour le nerf
Siatique Poplité Externe (SPE)**

Patient	Nerf SPE D				Nerf SPE G			
	M0		M3		M0		M3	
	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR	Amp.	SNR
1	1,9	0	2,6	4	2,7	-1	4,9	1
2*	0		NR		0		NR	
3	7,9	-1	7,7	1	7,9	6	7,3	2
4	6,5	1	4,1	-2	6,5	2	4,3	-3
5	0,5	-18	0,4	-21	6,7	-3	4,9	0
6	5,8	-2	5,2	0	6	-1	5,6	-2
7	7,3	1	6,9	-1	8,2	-2	5,4	4
8	7,7	-6	5,9	-4	8,2	-7	7,2	-1
9	4,6	1	5,8	2	3,9	-1	3,4	-2
10	3,6	-5	2,6	-1	5,8	4	5,9	-3
11**	0,6	-21	NR		2,4	-17	NR	

Groupe 1 (SLA d'évolution rapide) : patients 1 à 6, groupe 2 (SLA d'évolution lente, "survivants à long-terme") : patients 7 à 11. M0 : évaluation initiale, avant la biopsie; M3 : évaluation au cours du suivi à 3 mois. Amp. : Amplitude distale motrice (mV). Stimulation nerveuse répétitive (SNR) : variation d'amplitude mesurée à la 5ème stimulation (%). NR : non réalisé.

* Patient décédé avant l'évaluation à M3, ** Patient ayant refusé l'évaluation à M3.

Comparaison entre les 2 groupes de patients

Les amplitudes distales motrices moyennes des différents nerfs testés étaient comparables entre les 2 groupes de patients. Dans le groupe "SLA d'évolution rapide", un décrétement significatif était observé chez 2/6 patients à M0 et 2/5 patients à M3. Dans le groupe "SLA d'évolution lente" un décrétement significatif était mis en évidence chez 3/5 patients à M0 et chez 1/4 patients à M3. En regroupant les 2 évaluations (M0 et M3), un décrétement significatif était observé sur 5,3% (3/57) des nerfs testés dans le groupe "SLA d'évolution rapide" et 10,2% (5/49) des nerfs enregistrés dans le groupes "SLA lente". Cette différence n'était pas significative ($p = 0,49$).

2.2 Tests d'effort maximal bref

2.2.1 Principes d'analyse

Le test d'effort maximal bref permet d'apporter des arguments en faveur de l'origine présynaptique de l'atteinte de la TNM (Fournier, 1998). Il consiste à comparer l'amplitude de la réponse motrice obtenue après stimulation nerveuse unique, supramaximale, avant et après la réalisation d'un effort maximal avec le muscle concerné. Lors d'un effort maximal, les fibres nerveuses sont physiologiquement activées à une fréquence supérieure à 10Hz, fréquence supérieure au délai nécessaire au relargage du calcium à l'extérieur de la terminaison axonale. Le calcium s'accumule au sein de la terminaison nerveuse, entraînant une augmentation de la libération d'ACh à chaque stimulation. Ce phénomène de facilitation de la libération de l'ACh corrige la baisse de la quantité de neurotransmetteur libérée et le ppm augmente en amplitude. Chez le sujet sain, en l'absence d'altération de la TNM, toutes les fibres musculaires sont déjà activées par la stimulation nerveuse supramaximale. Cela ne s'accompagne donc pas d'une augmentation significative de l'amplitude motrice recueillie (augmentation $\leq 10\%$ habituellement). En cas d'atteinte présynaptique de la TNM en rapport avec un défaut de libération du neurotransmetteur, il en résulte une augmentation de l'amplitude et de la surface de la réponse motrice recueillie immédiatement après la fin de l'exercice : l'incrément ou facilitation post-exercice.

2.2.2 Résultats

Aucune facilitation post-exercice (incrément significatif, supérieur à 20%, immédiatement après effort bref maximal) n'a été mise en évidence sur les différents couples nerf-muscle testés, lors des évaluations réalisées à l'inclusion et au 3ème mois de suivi. En particulier, les

patients présentant un décrétement d'amplitude significatif en SNR ne présentaient pas d'incrément significatif au test d'effort.

3. Analyse de l'organisation topographique des JNM en microscopie confocale

3.1 Mise en évidence des cholinestérases

La présence de JNM au niveau de l'échantillon musculaire était décelable, par la méthode de révélation des cholinestérases de Koelle (Figure 6), pour 9 des 11 patients biopsiés. Pour 2 patients (patient n°5 du groupe 1 et patient n°10 du groupe 2), l'échantillon biopsique ne contenait pas de JNM détectables. Chez les 9 patients pour lesquels l'échantillon biopsique était analysable, le marquage par la fasciculine (inhibiteur spécifique de l'AChE) était présent et colocalisait avec les RACH, confirmant la présence de l'AChE au niveau des JNM. Le marquage anti-BChE était également présent, mais d'intensité plus variable selon les patients.

3.2 Modifications morphologiques du versant postsynaptique

Un total de 430 JNM ont été identifiées en microscopie confocale par le marquage des RACH par l' α -BGT couplée à la rhodamine. Pour chaque patient, différents co-marquages ont été réalisés sur des fragments de muscle distincts : pour les trois sous-unités neurofilamentaires par des Ac spécifiques et pour la cellule de Schwann terminale par un Ac dirigé contre la protéine S100.

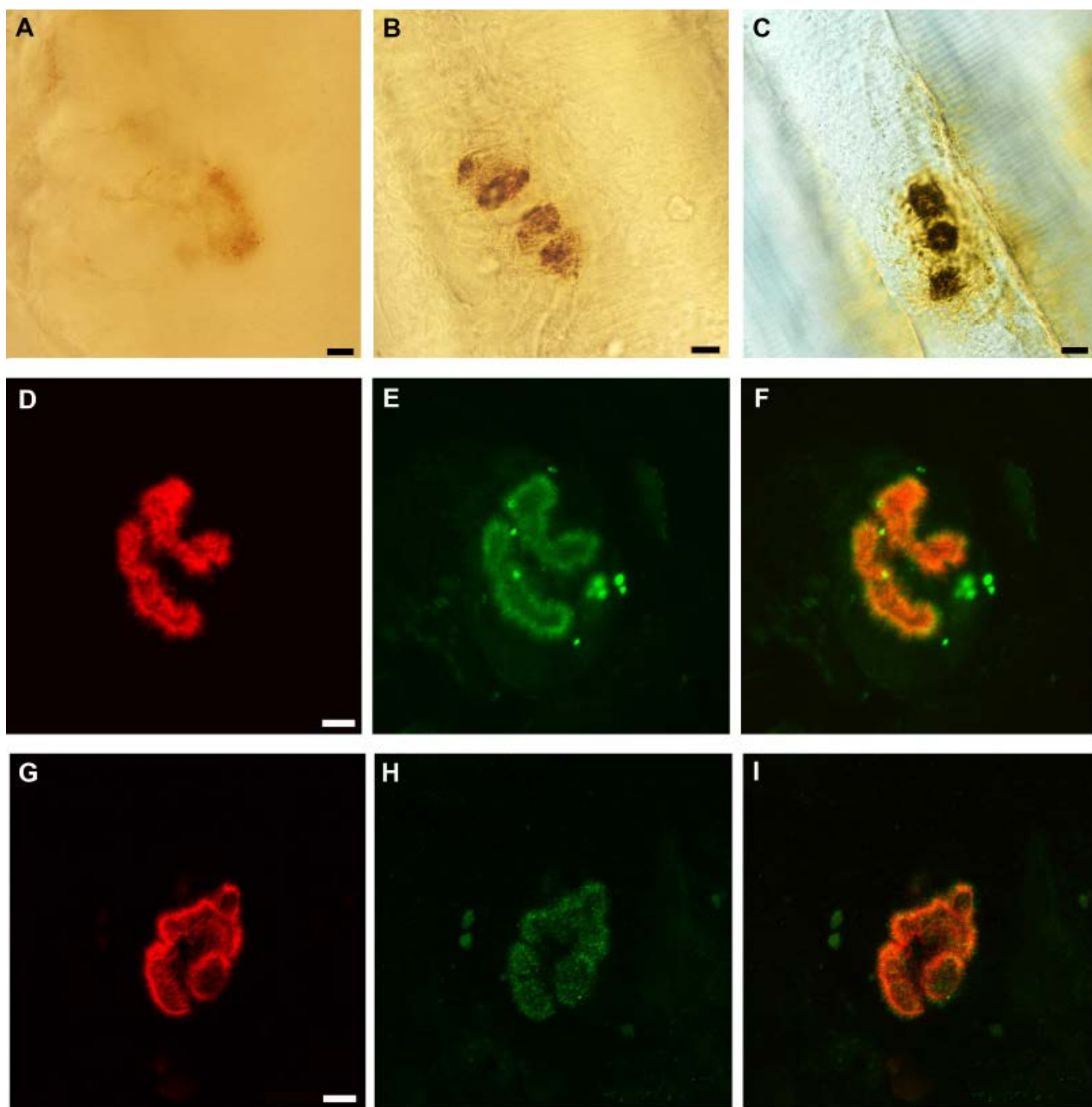


Figure 6 : Révélation de l'activité cholinestérasique et expression des 2 cholinestérases

A, B, C : Marquage de l'activité cholinestérasique révélée par la technique de Koëlle. Noter en **A** la franche diminution de l'activité cholinestérasique ("fantôme", JNM probablement totalement dénervée). **D, E, F** : Marquage des RCh (en rouge, **D**) par l' α -BGT couplée à la rhodamine et de l'AChE (en vert, **E**) par la fasciculine. Présence d'AChE colocalisant (**F**) avec les RCh. **G, H, I** : Marquage des RCh (en rouge, **G**) par l' α -BGT couplée à la rhodamine et de la BChE (en vert, **H**) par un Ac spécifique. Présence de BChE colocalisant (**I**) avec les RCh. Barre d'échelle (A- C) : 10 μ m, (D - I) : 5 μ m.

3.2.1 Modifications en rapport avec la dénervation

Le versant musculaire des JNM, ou gouttière synaptique, était marqué au niveau des RACH par l' α -BGT couplée à la rhodamine. Chez l'homme, le compartiment postsynaptique peut normalement prendre un aspect dit en "bretzel" ou, occasionnellement celui de petits éléments disjoints mais très rapprochés (aspect dit en "patte de chat"). Des modifications du versant postsynaptique en rapport avec le processus de dénervation des JNM étaient visibles : élargissement et fragmentation, associés à un aplatissement de la gouttière synaptique (Figure 7). Au niveau de certaines JNM, le marquage des RACH était à peine visible ("fantômes", correspondant à des JNM totalement dénervées). Le versant postsynaptique était anormal chez tous les patients, pour la quasi totalité des JNM visibles. Pour de rares JNM "en patte de chat", l'aspect du marquage postsynaptique pouvait être considéré comme normal ou peu modifié (voir Figure 7E). Ce sous-type particulier de JNM étant déjà constitué, à l'état normal, de plusieurs petits éléments, les JNM "en patte de chat" n'ont pas été prises en compte dans la quantification de la fragmentation (voir paragraphe 3.2.2). Il est également à noter que, pour les rares JNM dont le versant postsynaptique pouvait être classé comme normal, l'aspect morphologique de l'innervation (voir paragraphe 3.3) n'était jamais normal.

3.2.2 Quantification de la fragmentation

La fragmentation des JNM a été quantifiée, pour chaque patient, sur l'ensemble des JNM co-marquées par l' α -BGT et par un Ac anti-neurofilament, afin de visualiser de façon conjointe la terminaison axonale. Les rares JNM "en patte de chat", fragmentées chez le sujet sain, n'ont pas été prises en compte dans la quantification de la fragmentation pathologique. Les JNM étaient le plus souvent fragmentées et constituées de 2 à 4 éléments (76,7 % de l'ensemble des JNM examinées, respectivement 81,6% dans le groupe "SLA d'évolution rapide" et 72,5% dans le groupe "SLA d'évolution lente"). Les JNM constituées d'un seul élément étaient plus rarement observées (8,5% des JNM), sauf chez les patients 1 et 8. Les JNM présentant plus de 4 éléments individualisables représentaient en moyenne 12,2% des JNM visualisées. Ce type de JNM était plus fréquemment observé chez le patient 11 (porteur d'une mutation SOD1, 38,1% des JNM analysées). Aucune différence significative n'était observée entre les 2 groupes de patients ($p=0,64$).

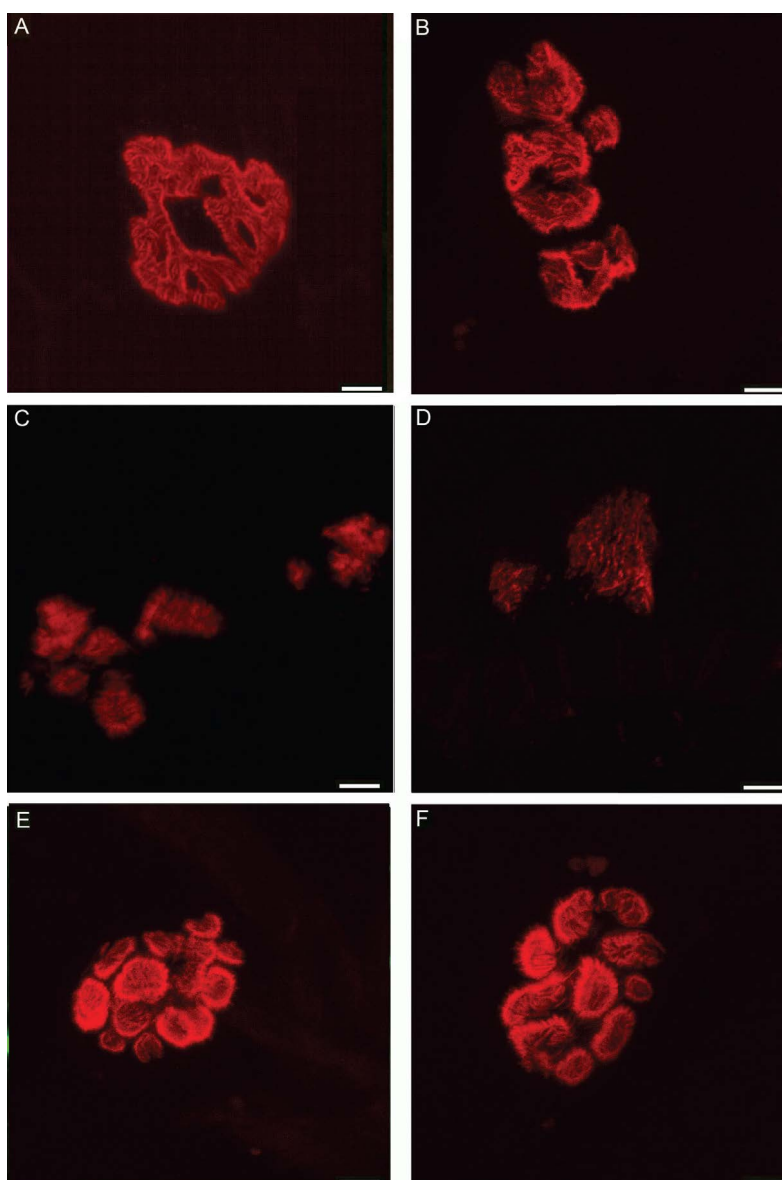


Figure 7 : Microscopie confocale. Modifications morphologiques du compartiment postsynaptique chez les patients atteints de SLA

A : JNM normale, compartiment post-synaptique bien circonscrit, en "bretzel" (sujet contrôle). **B** : Elargissement et fragmentation de la JNM, aplatissement de la gouttière se traduisant par une visibilité anormale du plissement. **C** : Idem B mais la fragmentation est plus marquée, la structure habituelle bien circonscrite est remplacée par des éléments épars. **D** : "Fantôme" de JNM, le marquage des RACH est très faible, la structure habituelle du versant postsynaptique n'est plus reconnaissable. **E** : Aspect en "patte de chat" normal, observé au niveau de certaines JNM humaines, où la JNM est constitué de petits éléments disjoints mais très rapprochés. **F** : JNM en "patte de chat" présentant un aspect de dénervation débutante avec écartement des éléments et aplatissement de la gouttière synaptique. Marquage des RACH (en rouge) par l' α -BGT couplée à la rhodamine. Barre d'échelle : 5 μ m.

Tableau 13: Quantification de la fragmentation du compartiment postsynaptique

Patients	JNM évaluées (n)	JNM constituées de 1 élément (n, [%])	JNM constituées de 2 à 4 éléments (n, [%])	JNM constituées de ≥5 éléments (n, [%])	JNM en "patte de chat" (n)
1	13	4 [30,8]	9 [69,2]	0 [0]	0
2	23	1 [4,3]	20 [87]	2 [8,7]	0
3	24	1 [4,2]	19 [79,2]	4 [16,7]	0
4	17	0 [0]	15 [88,2]	2 [11,8]	0
6	10	0 [0]	8 [80]	1 [10,0]	1
7	35	0 [0]	29 [82,9]	3 [8,6]	3
8	34	9 [26,5]	22 [64,7]	3 [8,8]	0
9	12	0 [0]	12 [100]	0 [0]	0
11	21	1 [4,8]	11 [52,4]	8 [38,1]	1
Total	189	16 [8,5]	145 [76,7]	23 [12,2]	5

Groupe 1 (SLA d'évolution rapide) : patients 1 à 6.

Groupe 2 (SLA d'évolution lente, "survivants à long-terme") : patients 7 à 11.

3.2.3 Aspect de "spiculation"

Après marquage des RACH, au niveau de certaines JNM, le pourtour de la gouttière primaire était anormal et semblait présenter des "pointes" dirigées vers l'extérieur. Cet aspect, auquel nous référerons sous le terme de "spicules" était visible au niveau de 33,5% des JNM (Figure 8, Tableau 14). Ce caractère spiculé était observé avec une fréquence variable selon les patients et pouvait prendre différents aspects en fonction du degré associé de fragmentation et d'élargissement de la JNM concernée : gouttière "spiculée" ou petites cupules "spiculées" isolées prenant parfois une apparence d'"oursin". Les images 2D obtenues en microscopie confocale sont formées à partir d'une pile de coupes ("stacks" z) acquises dans l'épaisseur de l'échantillon musculaire. A partir de ces coupes, il est possible d'effectuer des reconstructions en 3D (Figure 9). Cela nous a permis de montrer que ces spicules semblaient s'étendre principalement latéralement, à partir du bord de la gouttière. Ces spicules pourraient correspondre à la présence de RACH au niveau de la membrane musculaire immédiatement adjacente à la gouttière (ou cupule) concernée, comme le suggèrent les résultats de l'analyse ultrastructurale, qui seront détaillés paragraphe 4.

Tableau 14: Spiculation du compartiment postsynaptique

Patients	JNM évaluées (n)	JNM spiculées (n, [%])
1	34	11 [32,4]
2	68	20 [29,4]
3	61	19 [31,1]
4	41	12 [29,3]
6	41	2 [4,9]
7	58	12 [20,7]
8	70	51 [72,9]
9	22	13 [59,1]
11	35	4 [11,4]
Total	430	144 [33,5]

Groupe 1 (SLA d'évolution rapide) : patients 1 à 6.

Groupe 2 (SLA d'évolution lente, "survivants à long-terme") : patients 7 à 11

Comparaison des 2 groupes de patients

La fréquence des JNM "spiculées" était de 26.1% dans le groupe 1 et 43.2% dans le groupe 2.

Cette différence n'était pas significative ($p=0,34$).

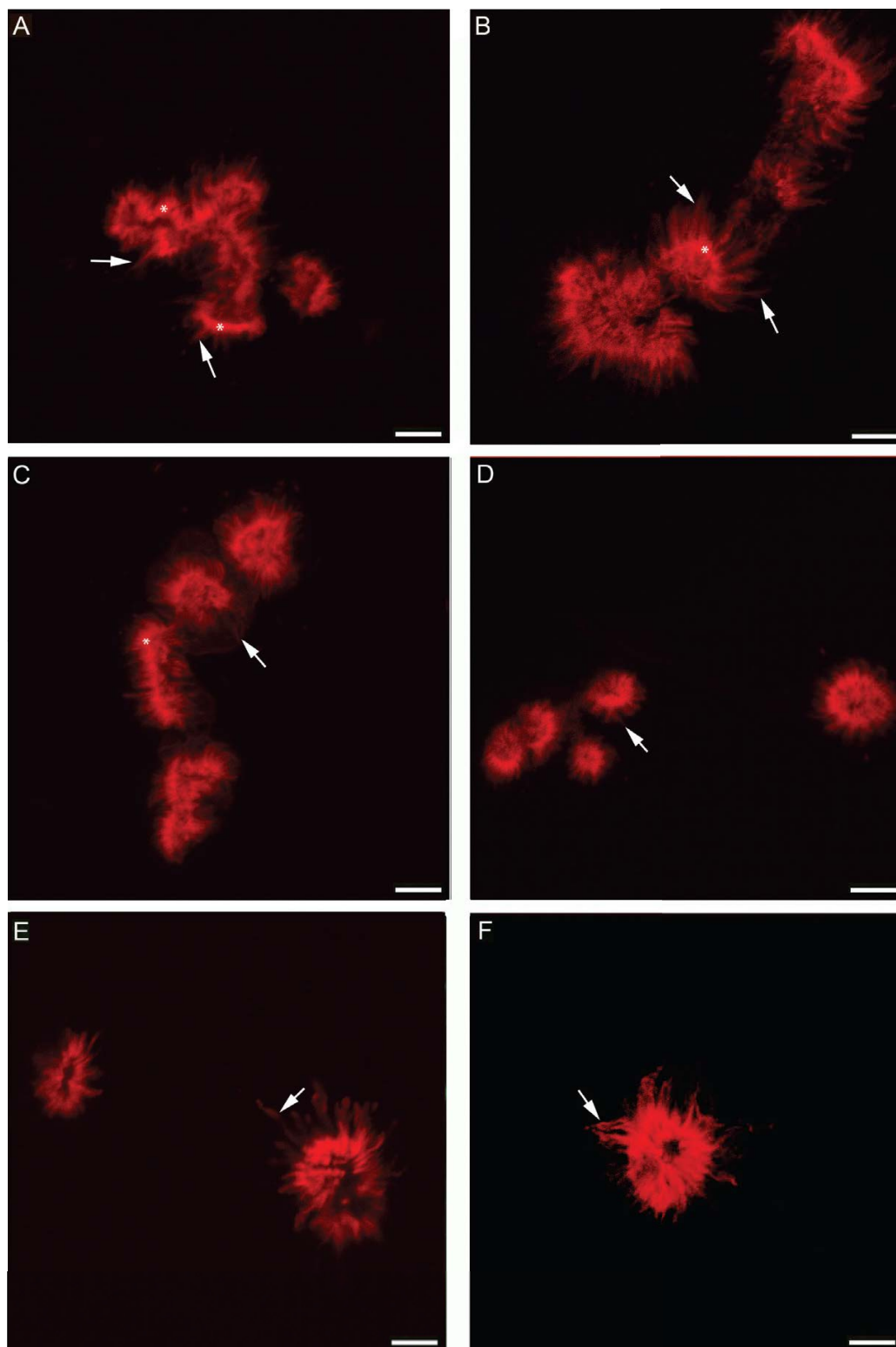


Figure 8 : Microscopie confocale.
Spiculation du compartiment postsynaptique chez les patients atteints de SLA

A, B et C : Compartiment postsynaptique avec différent degrés de fragmentation et de spiculation (flèches). La gouttière primaire reste bien individualisable et l'on en repère bien la bordure par son marquage plus intense (étoiles). **D, E** : Petits éléments postsynaptiques individualisés pouvant prendre un aspect de cupule (D, à gauche) ou une forme arrondie (D à droite, E) en fonction de l'angle de visualisation. Spiculation modérée (D, flèche) ou marquée (E, flèche). **F** : aspect uniforme du marquage des RACH traduisant l'aplatissement de l'élément postsynaptique, associé à une spiculation importante (flèche) : aspect en "oursin". Marquage des RACH (en rouge) par l' α -BGT couplée à la rhodamine. Barre d'échelle : 5 μ m.

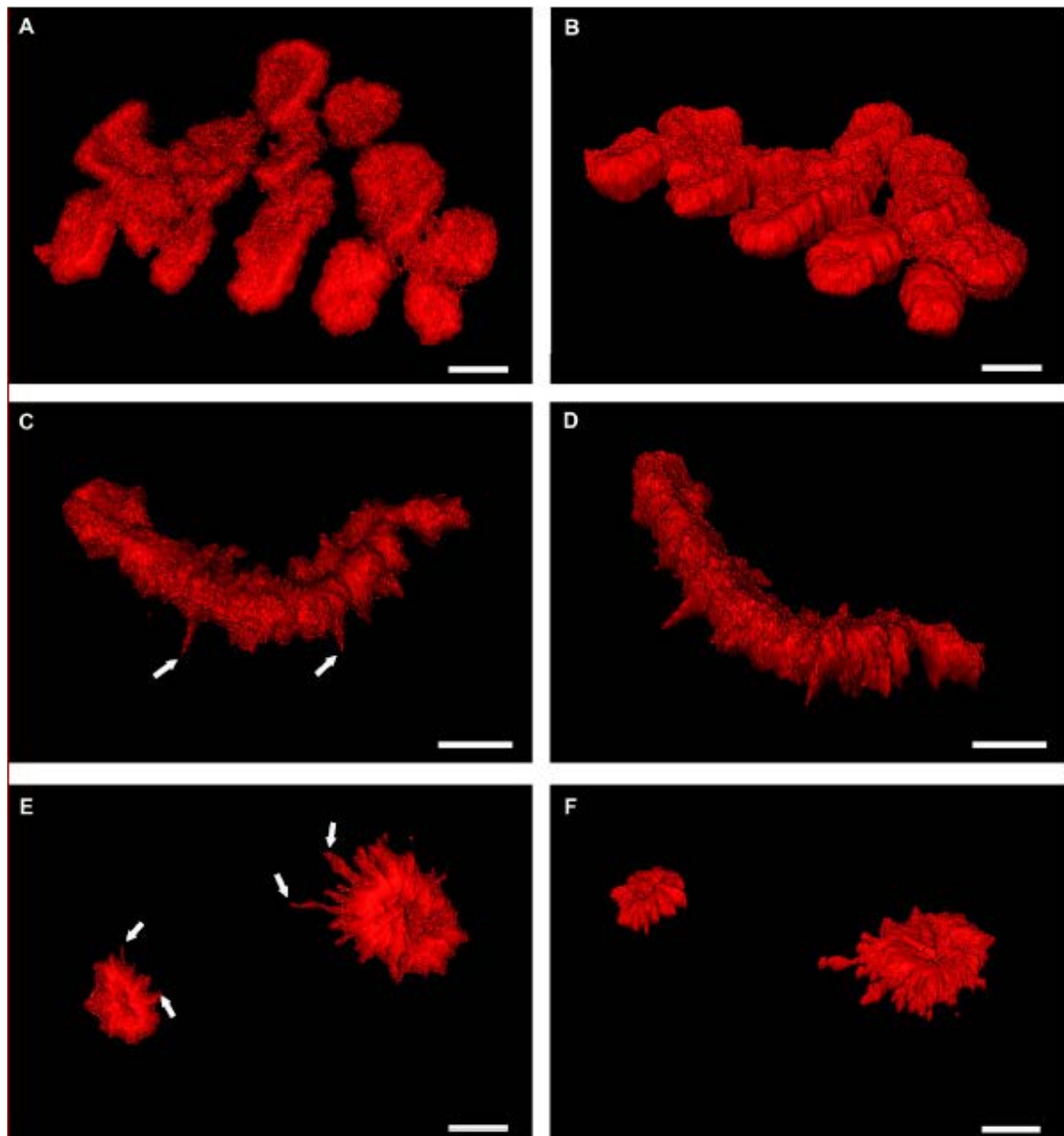


Figure 9 : Reconstructions 3D de compartiments postsynaptiques sans et avec spiculation

Images réalisées à partir de reconstructions en 3D surfacique (logiciel ImageJ) de compartiments postsynaptiques observés en microscopie confocale, après marquage des RACH (en rouge) par l' α -BGT couplée à la rhodamine.

A, B: Compartiment postsynaptique en "patte de chat", discrètement fragmenté, sans spiculation, vue de dessus (A) et vue oblique (B). **C, D:** Gouttière primaire "spiculée". Des "spicules" sont visibles, naissant latéralement du bord de la gouttière (flèches). Vue de dessus (C) et vue oblique (D). **E, F:** Reconstruction en 3D surfacique du compartiment postsynaptique présenté Figure 8E Cupules isolées, présentant une apparence "spiculée" marquée (flèches), vue de dessus (E) et vue oblique (F). Barre d'échelle : 5 μ m.

3.3 Analyse de l'innervation

L'innervation des JNM a été analysée sur des fragments de muscles co-marqués pour les RACH (versant postsynaptique) et pour la terminaison de l'axone moteur par un Ac anti-neurofilament.

3.3.1 Analyse quantitative de la réinnervation

Dans chaque échantillon musculaire observé, les JNM ont été analysées et classées en 4 catégories (Tableau 15, Figure 10), en fonction de l'aspect de la membrane postsynaptique et de la terminaison de l'axone moteur :

- JNM "normale" : compartiment postsynaptique d'aspect normal, bien circonscrit (en forme de "bretzel" ou de "patte de chat"), ET aspect normal de l'arborisation terminale (chez l'homme, en microscopie confocale, se terminant habituellement comme une fourche faite de fines branches)
- JNM "vacante" : gouttière synaptique aplatie, fragmentée et dispersée, sans terminaison axonale au contact (JNM totalement dénervée)
- JNM "partiellement innervée" : compartiment postsynaptique d'aspect anormal (gouttière synaptique aplatie, fragmentée, élargie; ou cupules disjointes) faisant face à une innervation très partielle (le plus souvent JNM en cours de dénervation).
- JNM "réinnervée" : compartiment postsynaptique d'aspect anormal (gouttière synaptique aplatie, fragmentée et élargie; ou cupules synaptiques disjointes) correctement innervé par une arborisation terminale anormale. Nous avons regroupés ici les différents types de réinnervation suivants : bourgeonnement ("sprouting") terminal, bourgeonnement préterminal, réinnervation par un seul axone terminal innervant plusieurs cupules synaptiques (avec ou sans branchement). Les cupules isolées innervées par un seul axone terminal qui peuvent correspondre à des cupules isolées résiduelles d'une ancienne gouttière synaptique mais aussi à des JNM néoformées, ont été regroupées avec les JNM réinnervées.

Sur l'ensemble des JNM observées, 45,6% correspondaient à des JNM réinnervées, 19,7% à des JNM vacantes (totalement dénervées) et 34,7% des JNM étaient partiellement innervées (Tableau 15). Aucune JNM présentant une innervation d'aspect normal n'a été observée.

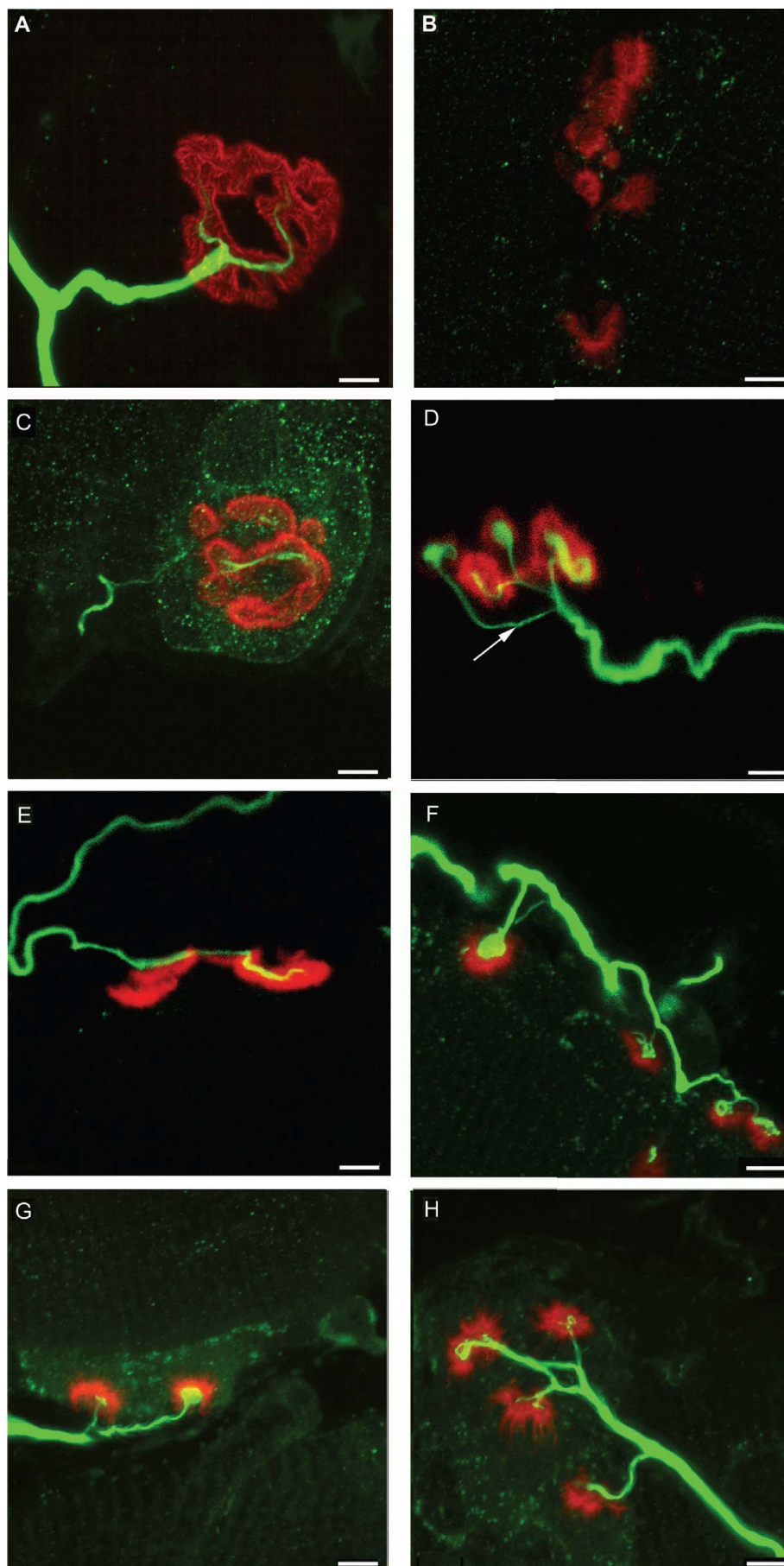


Figure 10 : Microscopie confocale.

Exemples d'innervation des JNM chez les patients atteints de SLA

A : JNM normale (sujet contrôle). **B** : JNM vacante, totalement dénervée : compartiment postsynaptique très fragmenté et élargi avec aplatissement de la gouttière synaptique; absence de terminaison axonale au contact. **C** : JNM partiellement innervée : compartiment postsynaptique élargi et fragmenté, innervation au contact très partielle par un axone filiforme (JNM remodelée, probablement en cours de dénervation). **D** à **H** : JNM réinnervées. Noter l'aspect anormal du compartiment postsynaptique dans tous les cas : gouttière synaptique fragmentée, élargie et aplatie (D, E) ou cupules synaptiques disjointes (F, G et H). **D** : l'axone terminal se divise en 3 branches avec une terminaison anormalement élargie en forme de bulbe. Noter le bourgeonnement préterminal (flèche): axone anormalement fin, terminé par une zone élargie évoquant un cône de croissance. **E** : un axone terminal unique innerve la gouttière synaptique (vue de profil) sans faire de branche de division. **F**, **G** et **H** : un axone terminal unique innerve plusieurs cupules synaptiques bien individualisées.

Marquage des RACH (en rouge) par l' α -BGT couplée à la rhodamine et de l'axone (en vert) par un Ac anti-neurofilament. Barre d'échelle : 5 μ m.

Tableau 15 : Classification de l'innervation des JNM pour chaque patient*

Patients	JNM évaluées (n)	JNM vacantes (n, [%])	JNM partiellement innervées (n, [%])	JNM réinnervées (n, [%])
1	15	2 [13,3]	3 [20]	10 [66,7]
2	30	10 [33,3]	12 [40]	8 [26,7]
3	28	11 [39,3]	7 [25]	10 [35,7]
4	24	6 [25]	10 [41,7]	8 [33,3]
6	23	6 [26,1]	9 [39,1]	8 [34,8]
7	36	3 [8,3]	15 [41,7]	18 [50,0]
8	34	5 [14,7]	10 [29,4]	19 [55,9]
9	14	2 [14,3]	5 [35,7]	7 [50,0]
11	24	0 [0]	8 [33,3]	16 [66,7]

Groupe 1 (SLA d'évolution rapide) : patients 1 à 6.

Groupe 2 (SLA d'évolution lente, "survivants à long-terme") : patients 7 à 11

(*)Aucune JNM normale n'a été observée.

Tableau 16 : Analyse quantitative globale de l'innervation des JNM

	Patients SLA (N=9)	Groupe 1 (N=5)	Groupe 2 (N=4)	P-value*
Nombre total de JNM observées	228	120	108	
Vacantes [n,(%)]	45 (19,7)	35 (29,2)	10 (9,2)	0,0004
Partiellement innervées [n,(%)]	79 (34,7)	41 (34,1)	38 (35,2)	NS
Réinnervées [n,(%)]	104 (45,6)	44 (36,7)	60 (55,6)	0,006
Normales [n,(%)]	0	0 (0)	0 (0)	

Groupe 1 : SLA d'évolution rapide

Groupe 2 : SLA d'évolution lente ("survivants à long-terme")

* Risque Alpha fixé à 0,017 (correction de Bonferroni). NS : non significatif.

Comparaison des 2 groupes de patients

Le nombre de JNM vacantes (dénervées) était significativement plus important dans le groupe 1 (29,2% contre 9,2% dans le groupe 2, $p=0,0004$). La proportion de JNM partiellement innervées était comparable dans les 2 groupes. La proportion de JNM réinnervées était significativement plus importante chez les patients du groupe 2 (55,6% contre 36,7% dans le groupe 1, $P=0,006$). La constatation d'une différence significative entre les 2 groupes de patients nous a conduit à nous intéresser plus spécifiquement aux facteurs musculaires pouvant influencer sur le développement et/ou le maintien de la réinnervation compensatrice dans la SLA. Ces résultats sont présentés dans la deuxième partie : "Etude de la réinnervation chez les patients SLA survivants à long-terme".

3.3.2 Caractéristiques de l'innervation chez les patients atteints de SLA

Nous avons ensuite cherché à déterminer les caractéristiques morphologiques de l'innervation des JNM. Lorsque cela était possible (en fonction de l'angle d'observation en particulier), nous avons analysé pour chaque JNM innervée (partiellement innervée ou réinnervée) les différents paramètres "qualitatifs" suivants (Figure 11) :

- Nombre d'axones par JNM
- Nombre de branches de division du 1^{er} ordre au niveau de l'arborisation terminale
- Nombre total de bourgeons (regroupant les bourgeons nodaux, préterminaux, ultraterminaux) par axone
- Ratio d'occupation du versant postsynaptique : correspond à la fraction du compartiment postsynaptique en contact avec l'innervation (ratio = 1 si la totalité du compartiment postsynaptique est innervé).

Le nombre d'axones par JNM était habituellement de 1 (Tableau 17). Chez certains patients (en particulier dans le groupe "SLA lente", mais pas exclusivement), des JNM polyinnervées par 2 axones distincts étaient occasionnellement visibles. L'arborisation terminale était globalement peu ramifiée, avec 1,10 branches de division du 1^{er} ordre en moyenne pour l'ensemble des patients étudiés. Chaque axone donnait naissance, en moyenne, à 1,02 bourgeons ("sprouts"). Enfin, le ratio moyen d'occupation du compartiment postsynaptique était de 0,70.

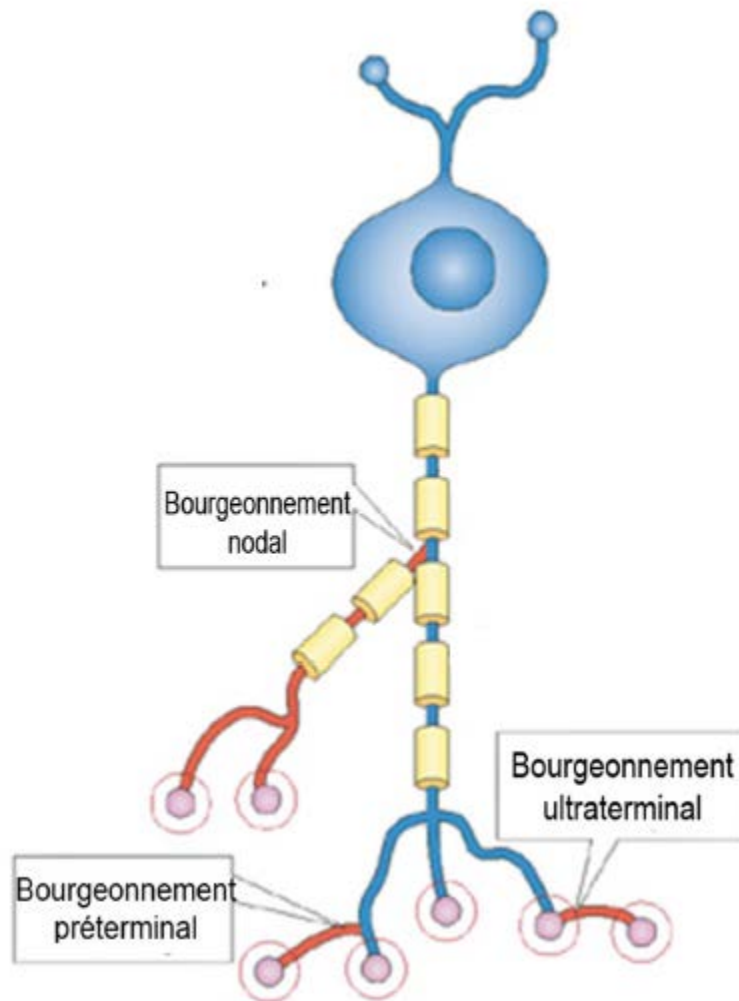


Figure 11 : Représentation schématique des différents types de bourgeonnement ("sprouting"). Adapté de Zacchigna et collaborateurs (Zacchigna et al., 2008).

Le bourgeonnement axonal ("sprouting") peut se produire au niveau de la plaque motrice (bourgeonnement ultraterminal), au niveau de la portion terminale, non myélinisée, de l'axone moteur (bourgeonnement préterminal) ou au niveau des nœuds de Ranvier de l'axone moteur (bourgeonnement nodal).

Tableau 17: Caractéristiques de l'innervation des JNM pour l'ensemble des patients SLA

Patients	JNM analysables (n)	Nbre d'axones par JNM*	Nbre de branches de division du 1er ordre/ axone*	Nbre de bourgeons par axone*	Ratio d'occupation du versant postsynaptique*
1	8	1	0,63	0,25	0,77
2	2	1	1,00	0,50	0,32
3	11	1	1,09	1,36	0,50
4	8	1	1,63	1,25	0,65
6	14	1,07	0,93	1,40	0,70
7	22	1,09	1,79	1,38	0,78
8	23	1,04	0,91	0,42	0,79
9	8	1,13	0,89	1,56	0,66
11	11	1	0,36	0,73	0,64
Total	107	1,05	1,10	1,02	0,70

Groupe 1 (SLA d'évolution rapide) : patients 1 à 6.

Groupe 2 (SLA d'évolution lente, "survivants à long-terme") : patients 7 à 11

(*) Valeurs moyennes pour chaque patient, et pour l'ensemble des JNM analysées chez les 9 patients.

Comparaison des 2 groupes de patients

Aucune différence n'était mise en évidence entre les 2 groupes de patients SLA concernant les caractéristiques de l'innervation. Le nombre moyen d'axones par JNM était égal à 1,02 dans le groupe 1 et 1,06 dans le groupe 2, avec respectivement 1,05 et 1,14 branches de division du 1er ordre en moyenne par axone ($p=0,7$). Chaque axone donnait naissance, en moyenne, à 1,11 bourgeons dans le groupe 1 et 0,96 bourgeons dans le groupe 2 ($p=0,54$). Enfin, le ratio moyen d'occupation du compartiment postsynaptique était respectivement de 0,65 dans le groupe 1 et 0,74 dans le groupe 2 ($p=0,15$).

3.4 Morphologie de la cellule de Schwann terminale

L'étude morphologique de la cellule de Schwann terminale a été réalisée en utilisant un Ac spécifiquement dirigé contre la protéine S100, associé à un co-marquage des RACH du versant postsynaptique. A l'état normal, la cellule de Schwann terminale coiffe par un petit processus cytoplasmique chaque terminaison nerveuse. Après dénervation, la cellule de Schwann terminale émet des prolongements cytoplasmiques qui vont croître pour ensuite guider la réinnervation. Pour chaque JNM analysable, nous avons déterminé le nombre

d'éléments postsynaptiques en contact avec une même cellule de Schwann. Nous avons également quantifié le nombre de prolongements par cellule de Schwann (Figure 12) lorsque cela était possible (en fonction de l'incidence d'observation, la superposition des différents prolongements schwanniens ne permettait pas, dans certains cas, d'évaluer leur nombre de façon précise). Pour l'ensemble des patients étudiés (Tableau 18), le nombre moyen d'éléments postsynaptiques en contact avec une cellule de Schwann terminale était de 1,90. Chaque cellule de Schwann émettait en moyenne 2,22 prolongements.

Comparaison des 2 groupes de patients

Aucune différence significative n'était objectivée entre les 2 groupes de patients. Le nombre moyen d'éléments postsynaptiques contactés par une cellule de Schwann terminale était respectivement de 1,75 et 2,18 dans les groupes 1 et 2 ($p=0,16$). Le nombre moyen de prolongements par cellule de Schwann était respectivement de 2,24 et 2,21 dans les groupes 1 et 2 ($p=0,95$).

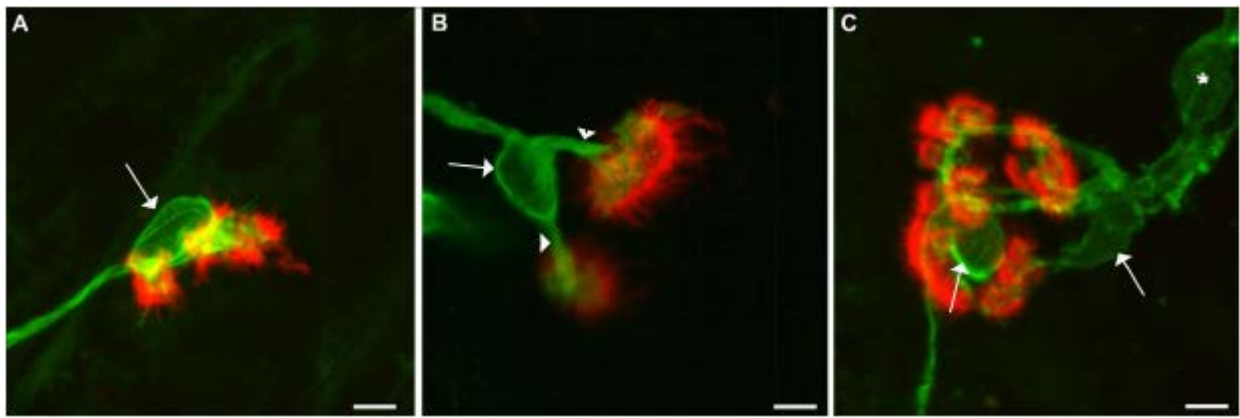


Figure 12 : Exemples des modifications morphologiques observées au niveau de la cellule de Schwann terminale en microscopie confocale

A : Une cellule de Schwann terminale (identifiée par son noyau, flèche) coiffe le compartiment postsynaptique, constitué de 2 cupules rapprochées. Il n'y a pas de prolongement schwannien. **B** : Une cellule de Schwann terminale (identifiée par son noyau, flèche) émet 2 prolongements (têtes de flèche), chaque prolongement allant contacter un élément postsynaptique. **C** : Exemple d'incidence de vue pour laquelle l'analyse quantifiée n'est pas possible. On peut dénombrer 2 cellules de Schwann terminales (noyau, flèche) mais le comptage des prolongements n'est pas possible. Noter le noyau Schwannien préterminal (étoile).

Marquage des RACH (en rouge) par l' α -BGT couplée à la rhodamine et de la cellule de Schwann (en vert) par un Ac anti-S100. Barre d'échelle : 5 μ m.

Tableau 18: Caractéristiques morphologiques des cellules de Schwann terminales pour l'ensemble des patients SLA

Patients	JNM analysables (n)	Nbre d'éléments postsynaptiques contactés par cellule de Schwann*	Nbre de prolongements par cellule de Schwann*
1	8	2,22	2,00
2	6	1,86	1,96
3	11	1,57	2,67
4	4	1,63	3,00
6	3	1,00	ND
7	6	2,58	2,38
8	10	2	2,17
9	1	3	2,00
11	2	1	2,00
Total	51	1,90	2,22

Groupe 1 (SLA d'évolution rapide) : patients 1 à 6.

Groupe 2 (SLA d'évolution lente, "survivants à long-terme") : patients 7 à 11

(*) Valeurs moyennes pour chaque patient, et pour l'ensemble des JNM analysées chez les 9 patients.

ND : non déterminable

3.5 Corrélations entre les anomalies morphologiques des JNM et les données cliniques et électrophysiologiques

Les corrélations entre les différentes anomalies morphologiques entre elles, et les paramètres cliniques (âge et score ALSFRS-R au jour de la biopsie, durée d'évolution de la maladie, taux de progression de l'atteinte fonctionnelle motrice au cours du suivi) et électrophysiologiques (amplitude du décrétement mesuré en SNR) ont été analysées par le test des rangs de Spearman.

3.5.1 Modifications du versant postsynaptique

La proportion de JNM spiculées était corrélée positivement avec le nombre moyen d'éléments postsynaptiques par cellule de Schwann ($p = 0,01$, $r = 0,628$). Aucune corrélation n'était mise en évidence entre la proportion de JNM spiculées et la proportion de JNM réinnervées. La proportion de JNM spiculées ne corrélait avec aucun des autres paramètres morphologiques analysés, et avec aucun des différents paramètres cliniques ou électrophysiologiques testés.

3.5.2 Innervation

Aucune corrélation n'était mise en évidence entre la proportion de JNM réinnervées et les modifications observées au niveau des cellules de Schwann terminales (en particulier avec le nombre de prolongements moyen par cellule de Schwann). La proportion de JNM réinnervées était négativement corrélée avec le nombre moyen de branches de division du 1^{er} ordre par axone ($p = 0,050$, $r = -0,681$). Le nombre moyen d'axones par JNM corrélait positivement ($p = 0,025$, $r = 0,749$) avec la durée d'évolution de la maladie et négativement avec le taux de progression de l'atteinte fonctionnelle motrice au cours du suivi ($p = 0,031$, $r = -0,730$). Le nombre moyen d'axones par JNM était également corrélé avec le nombre moyen de bourgeons émis par axone ($p = 0,050$, $r = 0,676$). Enfin, le taux de progression de l'atteinte fonctionnelle motrice au cours du suivi corrélait négativement avec le ratio d'occupation du versant postsynaptique ($p = 0,043$, $r = -0,700$).

3.5.3 Résultats électrophysiologiques

Six patients présentaient un décrétement d'amplitude de la réponse motrice mesurée après SNR, sur le muscle biopsié (pour les biopsies d'anconé, $n = 2$), ou sur le muscle trapèze homolatéral (autre muscle de l'épaule - pour les 4 biopsies de muscle deltoïde). Chez ces patients, l'amplitude du décrétement corrélait négativement avec la proportion de JNM réinnervées ($p = 0,033$, $r = -0,851$) : le décrétement enregistré était d'autant plus grand que le pourcentage de JNM réinnervées était faible. Aucune autre corrélation n'était mise en évidence entre les résultats de l'étude de la transmission neuromusculaire (décrétement en SNR) et les modifications morphologiques des JNM.

4. Analyse ultrastructurale des JNM

4.1 Modifications de l'innervation

Au niveau de la plupart des JNM observées, l'innervation était très réduite : diminution du nombre et de la taille de profil axonaux faisant face à la membrane musculaire (Figure 13A). Certaines plaques motrices étaient totalement dénudées, avec une absence totale d'élément nerveux (Figure 13B).

4.2 Modifications du compartiment postsynaptique

De nombreuses gouttières synaptiques étaient aplaties (Figure 14A). Par ailleurs, malgré la réduction importante de l'innervation, l'appareil sous-neural était le plus souvent bien conservé (Figure 13A et 14A). Un liseré dense aux électrons était visible de façon normale au sommet des plis sous-neuraux, traduisant la présence des RACH à ce niveau. Au niveau de certaines JNM, ce liseré dense aux électrons s'étendait à la zone de la membrane musculaire postsynaptique immédiatement adjacente à la gouttière synaptique résiduelle (Figure 14B), faisant évoquer la présence de RACH à cet endroit. La présence de RACH au niveau de cette zone de membrane postsynaptique immédiatement adjacente à la gouttière synaptique résiduelle, mais ne présentant plus de plis sous-neuraux, pourrait ainsi expliquer sur un plan ultrastructural l'aspect de "spiculation" du compartiment postsynaptique observé en microscopie confocale.

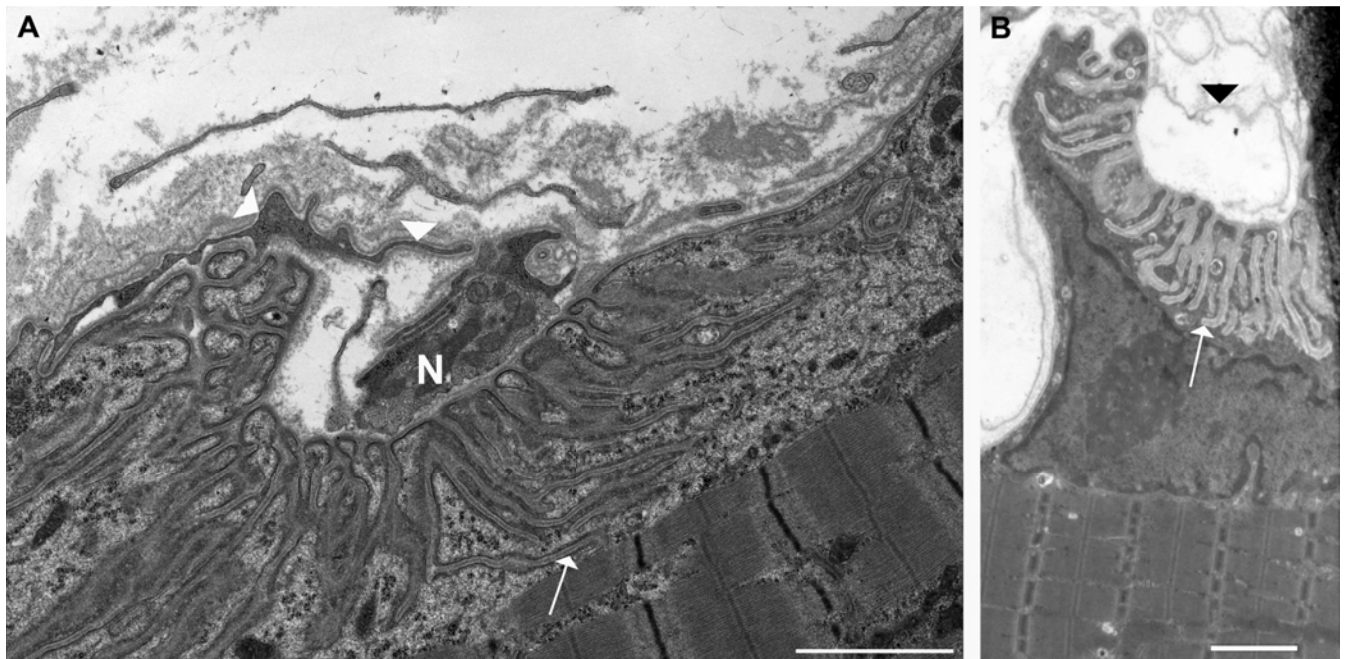


Figure 13 : Exemples de JNM partiellement (A) ou totalement (B) dénervée en microscopie électronique

A : Profil axonal (N) de petite taille, occupant partiellement la gouttière synaptique, dont les plis sous-neuraux (flèche) sont bien conservés. Tête de flèche : cellule de Schwann terminale.
B : Absence de terminaison nerveuse : dénervation complète. Flèche : plis sous-neuraux. Tête de flèche : Lame basale Schwannienne résiduelle. Barre d'échelle : 2µm.

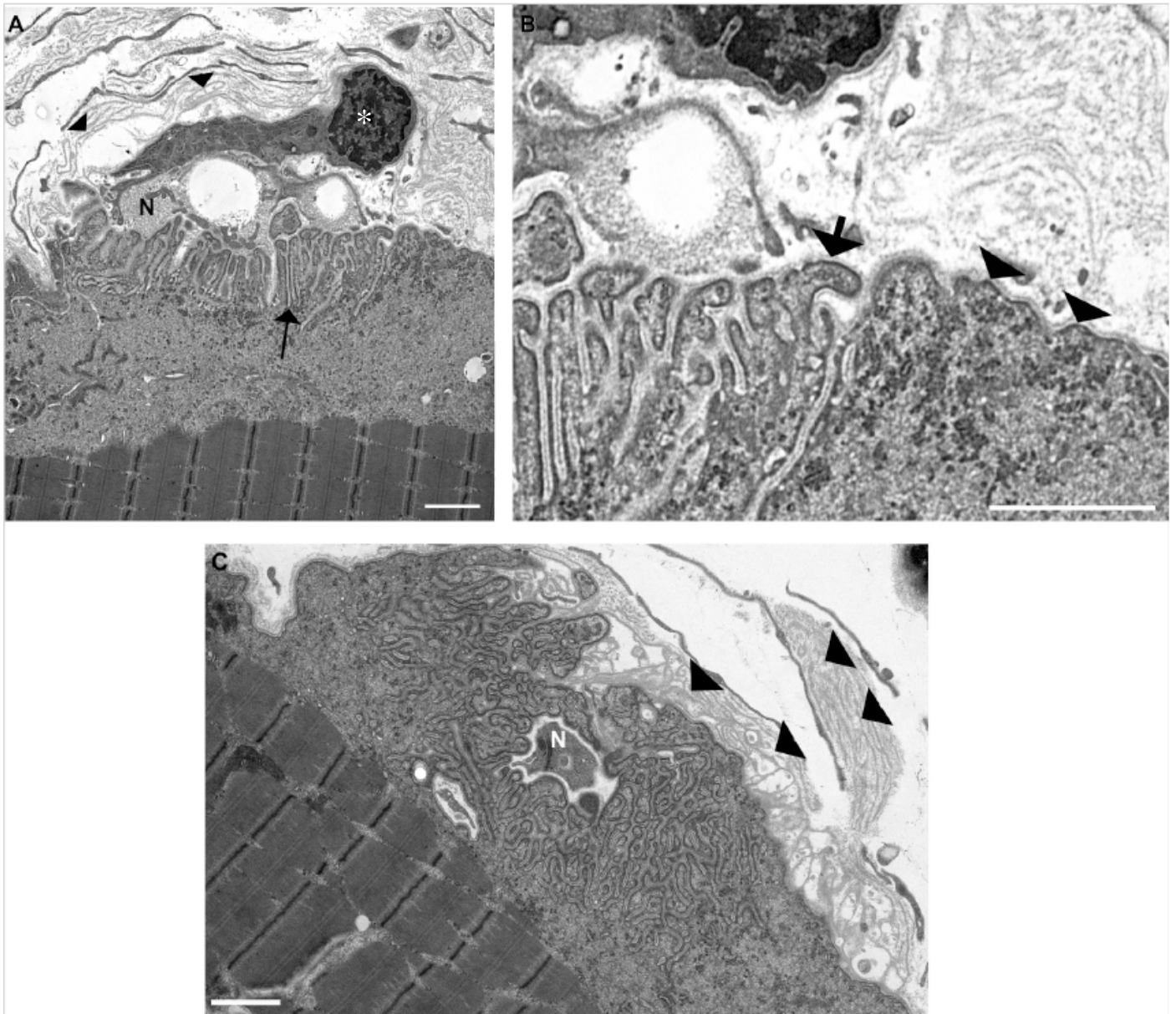


Figure 14: Microscopie électronique. Présence de RACH au niveau de la membrane musculaire synaptique en l'absence de plissement sous-neural. Empilements de lames basales Schwanniennes.

A : Gouttière synaptique aplatie avec persistance des plis sous-neuraux (flèche). N : terminaison nerveuse remaniée (les vacuoles visibles à l'intérieur sont probablement d'origine artéfactuelle). Etoile : Noyau de la cellule de Schwann terminale. Têtes de flèche: Empilements de lames basales Schwanniennes. **B :** On note un liseré dense aux électrons au niveau des crêtes des plis sous-neuraux (flèche à gauche, présence normale des RACH à ce niveau), mais également au niveau de la membrane musculaire adjacente en zone synaptique: présence de RACH au niveau d'une zone de membrane postsynaptique ne présentant pas de plis sous-neuraux (têtes de flèche à droite). **C :** Empilements de lames basales Schwanniennes, en rapport avec les phénomènes d'expansion/rétraction des processus Schwanniens (flèches). N : terminaison nerveuse. Barres d'échelle : 2μm.

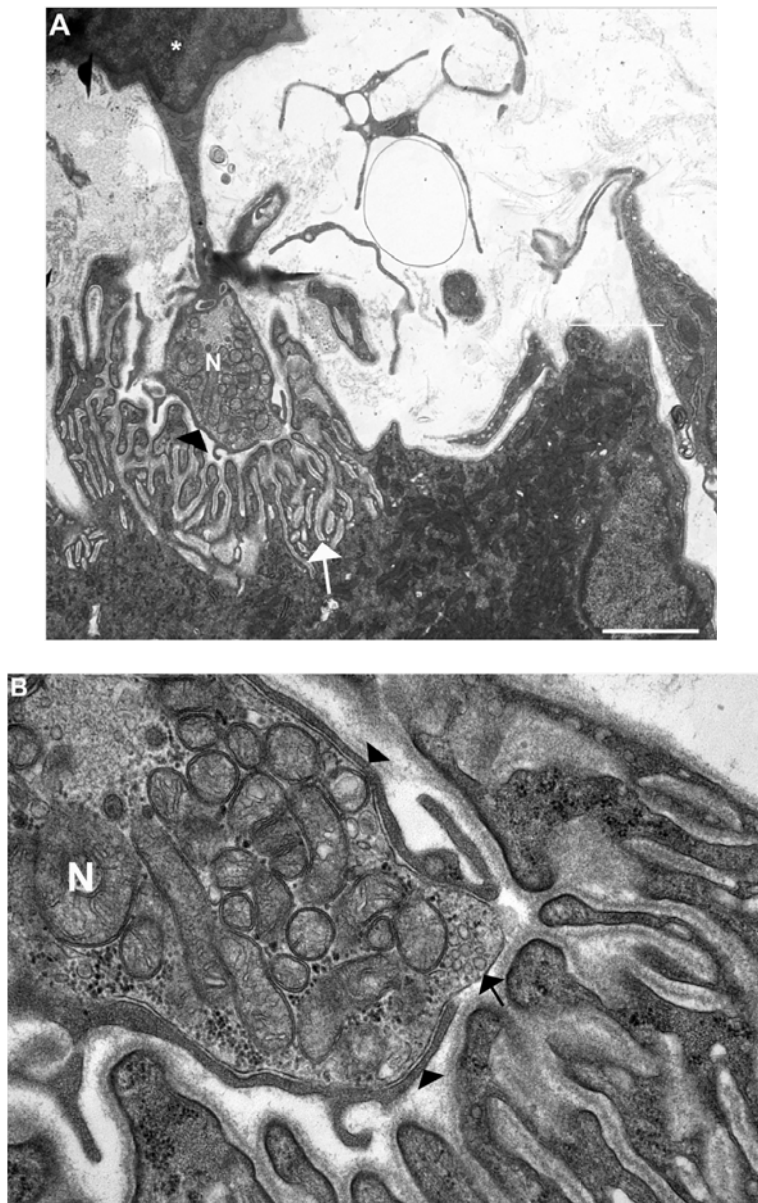


Figure 15 : Microscopie électronique. Interposition de la cellule de Schwann terminale dans la fente synaptique.

A : Cellule de Schwann terminale (étoile), dont la membrane s'infiltré dans la fente synaptique (tête de flèche) et engaine la terminaison nerveuse (N). Gouttière synaptique avec persistance des plis sous-neuraux (flèche). **B** : La terminaison nerveuse (N) est quasiment totalement entourée par la membrane schwannienne (tête de flèche), qui ne laisse qu'une petite zone libre pour la transmission synaptique (flèche). Barre d'échelle : 2µm.

4.3 La cellule de Schwann terminale

A coté de l'aspect normal où la cellule de Schwann terminale "coiffait" la terminaison nerveuse (Fig. 14A), on pouvait observer au niveau de certaines JNM la présence de la cellule de Schwann terminale dans la gouttière synaptique, prenant la place de la terminaison nerveuse. Des modifications morphologiques plus inhabituelles (Figure 15) étaient parfois visibles avec une véritable interposition de la cellule de Schwann entre la terminaison nerveuse et la membrane postsynaptique (Figure 15A). Cette interposition Schwannienne était parfois très marquée, ne laissant qu'une petite zone "libre" pour la transmission synaptique (Fig. 15B). Au niveau de certaines JNM, des liserés de faible densité aux électrons étaient également discernables (Figure 14C) correspondant à des empilements de lames basales Schwanniennes.

5. Analyse morphométrique et histochimique des fibres musculaires

Les résultats de l'analyse morphométrique et du typage des fibres musculaires sont présentés dans le tableau 19. Le diamètre moyen des fibres musculaires et la proportion de fibres atrophiques des deux types n'étaient pas significativement différents entre les deux groupes. Il existait une tendance à une prédominance des fibres de type I dans le groupe 2 (SLA d'évolution lente).

**Tableau 19: Analyse morphométrique des fibres musculaires
(biopsies de muscle deltoïde)**

	Contrôles (n=6)	Groupe 1 (n=3)	Groupe 2 (n=4)
Diamètre des fibres de type I (µm)	47,63 [4,24]	53,63 [15,76]	54,19 [18,85]
Diamètre des fibres de type II (µm)	49,80 [7,68]	47,37 [14,26]	39,38 [0,06]
% de fibres de type I atrophiques	NA	36,06 [20,76]	33,01 [26,11]
% de fibres de type II atrophiques	NA	43,59 [22,61]	34,35 [9,12]
% de fibres de type I	50,2 [3,3]	54,7 [6,3]	77,8 [26,6]

Groupe 1 : SLA d'évolution rapide, Groupe 2 : SLA d'évolution lente ("survivants à long-terme").

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne, [déviations standard]. NA : non applicable. Pour chaque type de fibres, les fibres atrophiques ont été définies comme ayant un diamètre inférieur à 2 déviations standard au dessous du diamètre moyen des fibres du même type mesuré chez les sujets témoins.

PUBLICATION N°1 : ETUDE DE LA REINNERVATION CHEZ LES PATIENTS SLA "SURVIVANTS A LONG TERME"

1. Résumé

La Sclérose Latérale amyotrophique (SLA) est une affection neurodégénérative progressive affectant les motoneurones du cortex cérébral, du bulbe et de la moelle épinière. Elle est responsable d'une paralysie musculaire progressive et entraîne le décès, généralement par insuffisance respiratoire, en 3 à 5 ans. Certains patients atteints de SLA présentent cependant une progression plus lente de la maladie et une survie prolongée, dont les mécanismes sous-jacents restent mal connus. Le seul traitement actuellement disponible, le riluzole, n'allonge que modestement la survie et n'a aucun effet sur la fonction musculaire. Dans la phase précoce de la maladie, le processus de réinnervation collatérale compense la perte en motoneurones fonctionnels. Mais cette réinnervation collatérale ne parvient pas à se maintenir au cours du temps, ce qui conduit à l'apparition du déficit moteur. Dans un modèle murin de SLA (souris transgénique porteuse d'une mutation sur le gène de la superoxyde dismutase), il a été suggéré récemment que l'histone déacétylase 4 (HDAC4) et son régulateur le microRNA miR-206 pouvaient influencer le développement de la réinnervation compensatrice et la progression de la maladie.

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer si la voie miR-206 - HDAC4 pouvait jouer un rôle dans la réinnervation musculaire chez les patients atteints de SLA, et contribuer ainsi aux différences d'évolutivité de la maladie. Pour cela, nous avons étudié en microscopie confocale la réinnervation au niveau des jonctions neuromusculaires (JNM) de 11 patients atteints de SLA, dont 5 patients présentant une progression lente avec survie prolongée (supérieure à 5 ans). Nous avons montré que la proportion des JNM réinnervées était significativement plus importante chez les patients présentant une progression lente par rapport aux patients présentant une progression rapide de la maladie. L'expression musculaire de HDAC4 était significativement plus importante chez les patients présentant une SLA d'évolution rapide et était inversement corrélée à l'importance de la réinnervation et au pronostic fonctionnel. L'expression musculaire de miR-206, régulateur potentiel de l'expression de HDAC4, était augmentée dans les 2 groupes de patients mais ne corrélait ni avec la réinnervation ni avec la progression de la maladie.

Ces résultats suggèrent que l'expression musculaire de HDAC4 peut être un facteur clé dans la réinnervation musculaire et l'évolutivité de la maladie chez les patients présentant une SLA. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de HDAC4 pourrait ainsi constituer une approche

thérapeutique pour améliorer les performances motrices et ralentir la progression de la maladie.

2. Publication n°1 : Muscle histone deacetylase 4 up-regulation in amyotrophic lateral sclerosis: potential role in reinnervation ability and disease progression

Brain (juillet 2013); doi: 10.1093/brain/awt164

Gaëlle Bruneteau, Thomas Simonet, Stéphanie Bauché, Nathalie Mandjee, Edoardo Malfatti, Emmanuelle Girard, Marie-Laure Tanguy, Anthony Behin, Frédéric Khiami, Elhadi Sariali, Caroline Hell-Remy, François Salachas, Pierre-François Pradat, Emmanuel Fournier, Lucette Lacomblez, Jeanine Koenig, Norma Beatriz Romero, Bertrand Fontaine, Vincent Meininger, Laurent Schaeffer et Daniel Hantai.

Muscle histone deacetylase 4 upregulation in amyotrophic lateral sclerosis: potential role in reinnervation ability and disease progression

Gaëlle Bruneteau,^{1,2,3} Thomas Simonet,⁴ Stéphanie Bauché,^{2,3,5} Nathalie Mandjee,^{2,3} Edoardo Malfatti,⁶ Emmanuelle Girard,⁴ Marie-Laure Tanguy,⁷ Anthony Behin,⁸ Frédéric Khiami,⁹ Elhadi Sariali,⁹ Caroline Hell-Remy,¹⁰ François Salachas,¹ Pierre-François Pradat,¹ Emmanuel Fournier,^{2,8} Lucette Lacomblez,¹ Jeanine Koenig,^{2,3} Norma Beatriz Romero,⁶ Bertrand Fontaine,^{2,3} Vincent Meininger,¹ Laurent Schaeffer⁴ and Daniel Hantai^{2,3,8}

1 APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Département de Neurologie, Centre référent SLA, Paris Cedex 13, France

2 Inserm UMR_S975, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris Cedex 13, France

3 Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

4 CNRS, UMR5239, IFR128, Université de Lyon, Ecole Normale Supérieure, Lyon, France

5 Ecole Pratique des Hautes Etudes, Paris, France

6 Hôpital Pitié-Salpêtrière, Unité de Morphologie Neuromusculaire, Institut de Myologie, Paris Cedex 13, France

7 APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Unité de Recherche Clinique, Paris Cedex 13, France

8 APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, centre de référence de pathologie neuromusculaire Paris-Est, Institut de Myologie, Paris Cedex 13, France

9 APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service d'Orthopédie, Paris Cedex 13, France

10 APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Département d'Anesthésie-Réanimation, Paris Cedex 13, France

Correspondence to: Dr Gaëlle Bruneteau,
Département de Neurologie, centre référent SLA,
Bâtiment Paul Castaigne,
Hôpital Pitié-Salpêtrière,
47-83 Bd de l'Hôpital,
75013 Paris, France
E-mail: gaelle.bruneteau@psl.aphp.fr

Amyotrophic lateral sclerosis is a typically rapidly progressive neurodegenerative disorder affecting motor neurons leading to progressive muscle paralysis and death, usually from respiratory failure, in 3–5 years. Some patients have slow disease progression and prolonged survival, but the underlying mechanisms remain poorly understood. Riluzole, the only approved treatment, only modestly prolongs survival and has no effect on muscle function. In the early phase of the disease, motor neuron loss is initially compensated for by collateral reinnervation, but over time this compensation fails, leading to progressive muscle wasting. The crucial role of muscle histone deacetylase 4 and its regulator microRNA-206 in compensatory reinnervation and disease progression was recently suggested in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (transgenic mice carrying human mutations in the superoxide dismutase gene). Here, we sought to investigate whether the microRNA-206–histone deacetylase 4 pathway plays a role in muscle compensatory reinnervation in patients with amyotrophic lateral sclerosis and thus contributes to disease outcome differences. We studied muscle reinnervation using high-resolution confocal imaging of neuromuscular junctions in muscle samples obtained from 11 patients with amyotrophic lateral sclerosis, including five long-term survivors. We showed that the proportion of reinnervated neuromuscular junctions was significantly higher in long-term survivors than in patients with rapidly progressive disease. We analysed the expression of muscle candidate genes involved in the reinnervation process and showed that histone deacetylase 4 upregulation was significantly greater in patients with rapidly progressive

Received December 19, 2012. Revised April 26, 2013. Accepted May 6, 2013. Advance Access publication July 3, 2013

© The Author (2013). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.

For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

disease and was negatively correlated with the extent of muscle reinnervation and functional outcome. Conversely, the proposed regulator of histone deacetylase 4, microRNA-206, was upregulated in both patient groups, but did not correlate with disease progression or reinnervation. We conclude that muscle expression of histone deacetylase 4 may be a key factor for muscle reinnervation and disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Specific histone deacetylase 4 inhibitors may then constitute a therapeutic approach to enhancing motor performance and slowing disease progression in amyotrophic lateral sclerosis.

Keywords: ALS; motor neuron; neuromuscular junction; reinnervation; HDAC

Abbreviations: ALS = amyotrophic lateral sclerosis; ALSFRS-R = revised ALS Functional Rating Scale

Introduction

In amyotrophic lateral sclerosis (ALS), motor neuron loss results in rapidly progressive muscle paralysis, usually leading to death from respiratory failure in 3–5 years (Charcot and Joffroy, 1869; Nelson, 1995). Riluzole, the only drug currently available, does not improve muscle strength or function (Lacomblez *et al.*, 1996). Although ALS is usually rapidly progressive, some patients with ALS can survive beyond 10 years (Zoccolella *et al.*, 2008). Long-term ALS survivors, defined as patients living a tracheostomy-free life for >5 years after symptom onset, represented 14% of the total ALS population in a recent study (Mateen *et al.*, 2010). Factors accounting for prolonged survival remain poorly understood. Early onset and predominance of upper motor neuron signs have been shown to be associated with long survival in some studies (Turner *et al.*, 2003; Zoccolella *et al.*, 2008), but not in others (Mateen *et al.*, 2010). Genetic factors may also be involved and patients carrying mutations in the superoxide dismutase (*SOD1*) gene have been reported with very long survival (>40 years) (Weber *et al.*, 2012).

In ALS, loss of functional motor neurons is initially followed by compensatory collateral reinnervation of denervated muscle fibres by the remaining motor neurons (Hansen and Ballantyne, 1978; McComas *et al.*, 1993). Consequently, clinical muscle weakness results from the dynamic interaction between primary loss of lower motor neurons and secondary compensation by collateral reinnervation (Bromberg *et al.*, 1993). Early in the course of the disease, motor neuron loss is compensated for by collateral reinnervation and strength is preserved. As the disease progresses, compensation fails leading to progressive muscle weakness. Compensatory reinnervation has also been demonstrated in mouse models of ALS (transgenic mice expressing human G93A or G85R mutation in the *SOD1* gene). In these mouse models a selective loss of fast-fatigable neuromuscular synapses (on type IIb muscle fibres) is initially observed. Fast fatigue-resistant motor neurons innervating the same muscle compartment at first sprout to partially reinnervate neuromuscular junctions on type IIb muscle fibres, but over time fail to maintain these additional synapses. In contrast, slow-type synapses seem particularly resistant to the disease process (Frey *et al.*, 2000; Pun *et al.*, 2006). Factors that protect resistant motor units remain to be identified. Some of these factors may be external to motor neurons themselves, as motor neurons are subjected to the influence of various cell types, such as neighbouring microglia, astrocytes and muscle fibres they innervate (Schaefer

et al., 2005). In a mouse model of ALS (G93A-*SOD1* transgenic mice), a crucial role of muscle histone deacetylase 4 (HDAC4) and its regulator microRNA-206 (MIR206) was recently suggested in compensatory reinnervation and disease progression (Williams *et al.*, 2009). MicroRNAs are small non-coding RNAs that negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level (van Rooij and Olson, 2007). MIR206, a skeletal muscle-specific microRNA, was shown to promote reinnervation and slow disease progression in ALS mice. MIR206 was able to repress muscle expression of HDAC4 and upregulate the expression of the secreted factor fibroblast growth factor binding protein 1 (FGFBP1) (Williams *et al.*, 2009), thus counteracting the negative effect of HDAC4 on reinnervation.

In this work, we sought to investigate whether the MIR206-HDAC4 pathway plays a role in muscle compensatory reinnervation in patients with ALS and underlies the diversity of disease progression. We studied reinnervation in muscle specimens from patients with ALS and showed that functional motor preservation and low progression rate were associated with a significantly greater compensatory reinnervation in muscle. We then analysed the expression of candidate genes involved in the reinnervation process and showed that upregulation of muscle HDAC4 could play a key role in muscle reinnervation and disease progression in patients with ALS.

Materials and methods

Patients and control subjects

Between March 2009 and April 2011, 11 patients with ALS (rapidly progressive ALS $n = 6$, long-term ALS survivors $n = 5$) referred from the Paris Motor Neuron Disease Centre were included in this study. The study was approved by the local ethics committee and all patients provided written informed consent consistent with institutional guidelines. All patients met the El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of definite or probable ALS (<http://www.wfnals.org>) (Brooks *et al.*, 2000). When enrolled in the study, all patients with ALS underwent extensive interview for family history of neurodegenerative disorders. None of the patients reported a family history of frontotemporal dementia. Only one patient (in the long-term survivors group) reported a family history of ALS, the remaining 10 patients being considered as apparently sporadic cases. With the patients' written informed consent, genetic testing was performed for mutation in the *SOD1*, *TARDBP* and *FUS* genes. After 2011, genetic

testing was also performed when possible during patient follow-up for the recently identified GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in the *C9orf72* gene. All patients in the long-term survivors group had >5 years of disease progression without requiring respiratory support or gastrostomy feeding. All patients were prospectively followed up every 3 months after muscle biopsy. Functional impairment was assessed using the revised ALS Functional Rating Scale (ALSFRS-R). ALSFRS-R is a 12-item scale that rates the performance of activities of daily living and scores from 0 (total disability) to 48 (no disability). Muscle strength was measured by manual muscle testing according to the grading system of the Medical Research Council, ranging from 0 (no visible movement) to 5 (normal muscle strength). For normal control specimens, six histochemically normal biopsy specimens of deltoid muscle were obtained from patients who were investigated for suspicion of muscle disease but were considered free of any neuromuscular disorder after morphological and histochemical examinations.

Motor-point muscle biopsy procedure

All patients underwent a muscle biopsy. Muscle specimens were removed from deltoid muscle by open biopsy under local anaesthesia for eight patients. The neuromuscular junction region was determined by the small twitch provoked by the tip of the scalpel on the surface of the muscle fascicles. For three patients, muscle samples were taken from anconeus muscle, under regional anaesthesia, using the technique described by Maselli *et al.* (1991, 1993).

Confocal imaging study of neuromuscular junctions

Immediately after biopsy was performed, the presence of neuromuscular junctions on a longitudinal strip of the specimen was confirmed using the classic Koelle method revealing cholinesterase activity (Koelle and Friedenwald, 1949). After fixation with 4% paraformaldehyde, whole mounts of muscle specimens were stained for acetylcholine receptors with rhodamine-conjugated α -bungarotoxin (1/500, tetramethylrhodamine α -bungarotoxin, Molecular Probes, Invitrogen), and for neurofilaments. As the different neurofilaments may not be expressed at the same time during the reinnervation process and depending on the size of the growing axon (Donahue *et al.*, 1988), immunostaining was performed for the three major neurofilament subunits for each patient, on separate muscle fragments. The following primary antibodies were used: 168 kDa neurofilament antibody (1/250, 2H3, Hybridoma Bank), 200 kDa neurofilament antibody (1/250, Chemicon) and 68 kDa neurofilament antibody (1/100, Abcam). Secondary antibodies used were Alexa Fluor[®] 488 anti-rabbit (1/200, Molecular Probes, Invitrogen) and Alexa Fluor[®] 488 anti-mouse (1/200, Molecular Probes, Invitrogen). The specimens were observed by confocal microscopy (Carl Zeiss LSM510). Neuromuscular junctions observed in each biopsy specimen were analysed and scored according to the relationship between the intrasynaptic axonal branches and the postsynaptic membrane. Neuromuscular junctions were classified into four categories (Huzé *et al.*, 2009; Ben Ammar *et al.*, 2013): normal, vacant, partially vacant and reinnervated neuromuscular junctions. Human normal neuromuscular junctions show a well-circumscribed postsynaptic apparatus that can be either 'pretzel-shape' or made of separated cups usually in close contact with each other. The appearance of the terminal arborization varies according to the staining procedure (Cöers, 1964). Under confocal microscope, after immunostaining for neurofilament, the axon

terminal commonly ends as a fork made of thin branches. Vacant neuromuscular junctions (completely denervated neuromuscular junction) are characterized by fragmented and dispersed synaptic gutters with evanescent borders and absence of nerve terminal profiles. Partially vacant neuromuscular junctions are remodelled neuromuscular junctions in which the axon terminal innervates some but not all of its fragmented gutters. Reinnervated neuromuscular junctions were identified based on the careful observation of both the presynaptic compartment and the postsynaptic apparatus. The postsynaptic apparatus of a reinnervated neuromuscular junction is abnormal and usually consists of a flattened and fragmented synaptic gutter with separated cups and evanescent borders. Based on the morphology of the presynaptic compartment, we regrouped several patterns of reinnervation in the reinnervated neuromuscular junctions group: preterminal sprouting, terminal sprouting, reinnervation with a single axon terminal innervating several cups with branching or without branching (*en passant* innervation). Innervated neoformed neuromuscular junctions (small newly formed synaptic cups contacted by a thin axon) were also classified in the reinnervated neuromuscular junctions group.

Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction analysis

MIR206 expression levels and messenger RNA levels of *HDAC4*, *FGFBP1*, $\alpha 1$ (*CHRNA1*) and γ (*CHRNA1*) subunit of acetylcholine receptors were determined using reverse transcription quantitative real-time PCR. After tissue disruption using a FastPrep[®]-24 Instrument (MPbiomedicals), total RNA was isolated in 750 μ l of TRI Reagent[®] (Sigma-Aldrich #T9424) according to the manufacturer's instructions, except that a second isopropanol precipitation was performed. Reverse transcription-PCR with random hexamer primers was done on 1 μ g of RNA samples using RevertAid[™] H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas, Thermo Fischer Scientific). Quantitative real-time PCR was performed twice in duplicate using the Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Genes used for normalization were *B2M*, *HPRT1*, and *ACTB*. Sequences of the primers are listed in Supplementary Table 1.

Western blot determination of HDAC4 muscle content

For western blot determination of HDAC4 muscle content, tissues were homogenized by FastPrep[®] in 250 μ l of cell suspension buffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, SigmaFAST[™] Protease Inhibitor Cocktail Tablets EDTA-Free). Total protein content was extracted by addition of Triton (1% final), with 0.5-h incubation on ice and a brief sonication (3 \times 10 s). Cell debris was pelleted at 1000g for 10 min and the supernatant was mixed with 83 μ l of 4 \times loading buffer (250 mM Tris pH 6.8, 8% SDS, 40% glycerol). Bromophenol blue (0.01% final) and DTT (0.1 M final) were added after protein determination, and the samples were boiled for 5 min. Protein lysates (25 μ g) were resolved on 8% SDS-PAGE gels using standard procedures and blotted onto PVDF membranes. Antibodies against HDAC4 [Santa Cruz Biotechnology (N-18) #sc-5245] were used at 1:1000 dilution. HDAC4 protein expression was quantified and normalized to Coomassie staining using ImageJ software.

Myofibrillar ATPase staining and morphometric analysis

Myofibrillar activity staining was performed at pH 9.4 on cryostat sections from deltoid muscle specimens following the method proposed by Brooke and Kaiser (1969). The mean diameter of myofibres and the percentage of type I and type II fibres were assessed using sections stained for myofibrillar ATPase (pH 9.4). About 400 muscle fibres per specimen were analysed by measuring all muscle fibres in four consecutive, non-overlapping fields. Digital photographs were obtained with a Zeiss AxioCam HRc attached to a Zeiss Axioplan Bright Field Microscope and processed with the AxioVision 4.4 software (Zeiss). For the each fibre type, atrophic fibres were defined as two standard deviations below the mean diameter measured in control subjects.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with XLSTATS 2012 software (Addinsoft) and SAS software version 8.2 (SAS Institute). Mann-Whitney U-tests were used to compare continuous data and Fisher's exact tests to analyse categorical data. Correlations were analysed using the non-parametric Spearman's rank correlation test. We used a generalized linear mixed model for clustered multinomial outcomes to test for an association between innervation status and disease group. All statistics were two-tailed and the level of significance was set at $P = 0.05$.

Results

Demographic and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis

The characteristics of patients and controls are summarized in Table 1 and Supplementary Table 2. Median disease duration at the time of the biopsy was 11.0 months (range 9–18) in the rapidly progressive ALS group and 100 months (range 72–193) in the long-term survivors group ($P = 0.004$). Long-term survivors were significantly younger at disease onset ($P = 0.022$). Other demographics were similar in the two groups. In the long-term survivor patient who reported a family history of ALS in a first-degree relative, we identified an exon 5 mutation on the *SOD1* gene (c.418A>G, amino acid numbering according to the ALS online database: N139D). We calculated disease progression rate during follow-up as follows:

$$\text{Disease progression rate} = \frac{(\text{ALSFRS-R score at 'time of biopsy'} - \text{ALSFRS-R score at 'last follow-up'}) / \text{follow-up duration after biopsy}}$$

The mean disease progression rate during follow-up was 3.018 units/month (range 0.584–9.130) in the rapidly progressive ALS group and -0.001 units/month (range -0.180 – 0.222) in the long-term ALS survivors group ($P = 0.004$). At the end of the study, four of six of the patients with rapidly progressive ALS were deceased [mean disease duration 28 (range 13–49) months], and one of six required permanent invasive ventilatory

support with tracheostomy. The remaining patient required non-invasive respiratory support. Conversely, long-term survivors showed almost no functional decline during follow-up (Fig. 1) and none of them died.

Muscle reinnervation ability is higher in long-term amyotrophic lateral sclerosis survivors

Using high-resolution confocal microscopy, we classified all identified neuromuscular junctions in muscle biopsy specimens into four categories (Fig. 2, Supplementary Fig. 1 and Table 2): vacant, partially vacant, reinnervated and normal neuromuscular junctions. The innervation status was significantly different between the two ALS groups ($P = 0.001$). Vacant neuromuscular junctions were significantly more frequent in the rapidly progressive ALS group than in the long-term survivors group (29.2% and 9.2%, respectively; $P = 0.0004$). The proportion of partially vacant neuromuscular junctions was similar in the two groups. Reinnervated neuromuscular junctions were significantly more frequent in the long-term survivors group than in the rapidly progressive ALS group (55.6% and 36.7%, respectively; $P = 0.006$). Normal neuromuscular junctions were not observed. Disease progression rate correlated negatively with the proportion of reinnervated neuromuscular junctions and positively with the proportion of denervated neuromuscular junctions (Fig. 3).

HDAC4 muscle upregulation is associated with faster functional decline and lower muscle reinnervation ability

We used reverse transcription quantitative real-time PCR to determine relative transcript expression levels for *MIR206*, *HDAC4* and *FGFBP1* in muscle specimens (Fig. 4 and Supplementary Fig. 2). As molecular markers of denervation intensity, *CHRNA1* and *CHRNA1* messenger RNA levels were also determined. *HDAC4* messenger RNA was moderately upregulated in patients with ALS when compared with controls (mean fold-change ratio 1.25, not significant), but *HDAC4* transcript upregulation was significantly higher in rapidly progressive patients with ALS (mean fold-change ratio 1.42 when compared with controls) than in long-term ALS survivors, who showed no *HDAC4* induction (mean fold-change ratio 1.05) (Fig. 4A). Muscle *HDAC4* transcript levels correlated positively with disease progression rate during follow-up (Fig. 4B). *CHRNA1* and *CHRNA1* transcripts were significantly upregulated in patients with ALS and, although the difference was not statistically significant, reached higher levels in the rapidly progressive group (Fig. 4A). Muscle *HDAC4* induction correlated positively with *CHRNA1* and *CHRNA1* messenger RNA levels (not shown). *MIR206* and *FGFBP1* transcripts were significantly upregulated in patients with ALS and reached higher levels in the long-term survivors group, but the difference between the two groups was not statistically significant (Fig. 4A). The Spearman rank correlation test showed that *FGFBP1* messenger RNA levels correlated positively with *MIR206* transcript levels (Fig. 5), but not with *HDAC4* transcript level nor with *HDAC4* relative protein content

Table 1 Demographic and clinical characteristics

Characteristics	Rapidly progressive ALS group (n = 6)	Long-term ALS survivors group	Statistics
Age, years	56.7 [48–63]	50.2 [36–55]	NS
Sex, male	3/6	3/5	NS
Age at disease onset (years)	55.3 [47–62]	41.4 [29–50]	$P = 0.022$
Bulbar onset, no. (%)	2 (33.3)	0 (0.0)	NS
Median disease duration at the time of biopsy (m)	11 [9–18]	100 [72–193]	$P = 0.004$
Rate of progression from symptom onset (units/month)*	1.271 [0.398–2.656]	0.115 [0.076–0.167]	$P = 0.004$
Disease progression rate during follow-up after biopsy (units/month)**	3.018 [0.584–9.130]	−0.001 [−0.180–0.222]	$P = 0.004$
ALSFRS-R at the time of biopsy	38.2 [30–46]	36.2 [32–41]	NS
Manual muscle testing***	4.5 [2–5]	4.0 [2–5]	NS
Follow-up duration after biopsy (m)	15 [1–39]	13 [6–18]	NS
Dead at the end of the study: n	4/6	0/5	
3-year survival probability (SE)	41.7% (0.2)	100%	$P = 0.13$
Disease duration (m)	28 [13–49]	NA	NA

Values are means, [range] unless otherwise specified. ALSFRS-R score 0 (total disability) to 48 (no disability). NA = not applicable; NS = not significant; SE = standard error.

*Rate of progression from symptom onset to last follow-up = (48 – ALSFRS-R score at last follow-up)/time from symptom onset to last follow-up.

**Disease progression rate during follow-up after biopsy = (ALSFRS score at time of inclusion – ALSFRS-R score at last follow-up)/follow-up duration.

The slightly negative mean disease progression rate in the long-term ALS survivor group reflects daily fluctuations in function usually based on tiredness or spasticity.

***Manual muscle testing: Medical Research Council scale for shoulder abduction (deltoid biopsies, $n = 8$) or elbow extension (anconeus biopsies, $n = 3$), range 0 (no visible movement) to 5 (normal muscle strength).

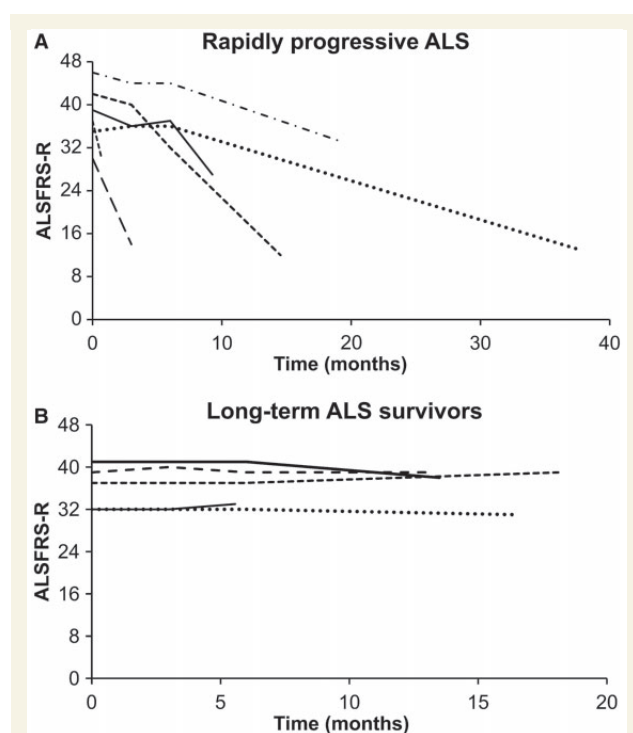


Figure 1 Temporal progression of the ALSFRS-R total score for each subject during follow-up after biopsy. (A) Rapidly progressive ALS group ($n = 6$). (B) Long-term ALS survivors group ($n = 5$).

determined by western blot (Fig. 4C). The extent of reinnervation determined on muscle specimens correlated with HDAC4 protein level ($P = 0.008$, negative correlation, Fig. 4D), but not with *MIR206* or *FGFBP1* induction levels.

Morphometric analysis

Morphometric analysis (Supplementary Table 3) showed no difference between the two groups in mean fibre size and fibre atrophy. There was a trend for predominance of type 1 muscle fibres in patients with ALS.

Discussion

In this work, we show that low progression rate in patients with ALS is associated with greater compensatory reinnervation and have identified HDAC4 as a potential key deleterious factor for muscle reinnervation and disease progression in ALS.

The first major result of our study is the demonstration that functional motor preservation over time (i.e. long-term survival in ALS) is not associated with a high proportion of normal neuromuscular junctions (natively innervated by motor neurons spared by the disease process), but with greater compensatory reinnervation in muscle. We studied muscle reinnervation in five long-term ALS survivors and six patients with rapidly progressive ALS. Data from mouse models of ALS show that muscles are affected differently according to their fibre type composition and that the disease process preferentially affects fast-fatigable synapses, on type IIb muscle fibres (Frey *et al.*, 2000; Pun *et al.*, 2006). As deltoid and anconeus are 'mixed' muscles in normal subjects (Johnson *et al.*, 1973; Saltin and Gollnick, 1983; Le Bozec and Maton, 1987), their vulnerability to disease can be considered as similar and we analysed data from these two muscles together. The characteristics of long-term ALS survivors were similar to those in previous reports on long survival in ALS, with younger age at onset (Turner *et al.*, 2003; Zoccollella *et al.*, 2008) and, although not statistically significant, less frequent bulbar presentation (Mateen

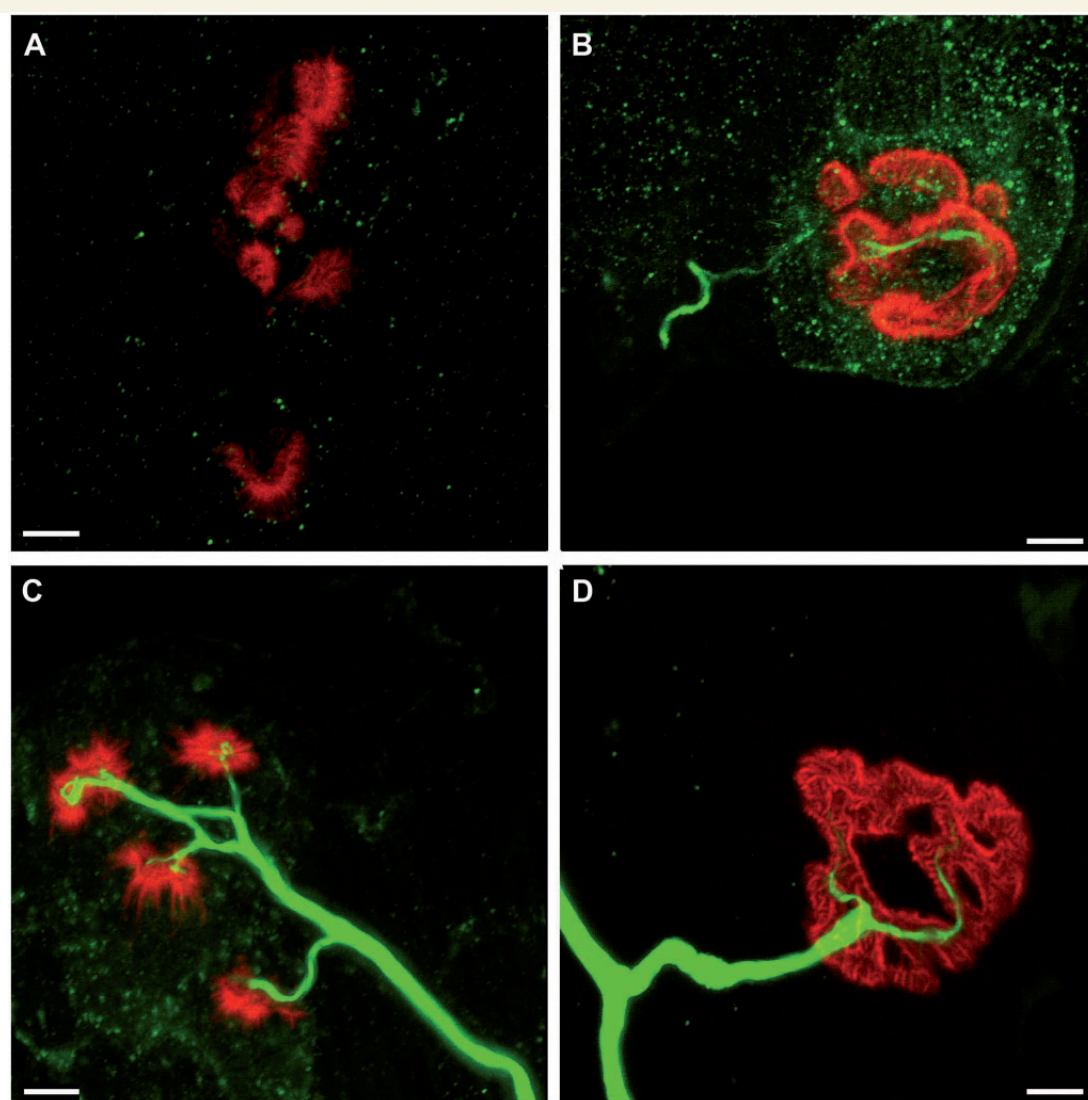


Figure 2 Neuromuscular junctions observed in ALS patient muscle biopsy specimens on confocal microscopy. Whole-mount preparations were stained for acetylcholine receptor with α -bungarotoxin in red and axon terminals with neurofilament antibody in green. Scale bars = 5 μ m. (A) Vacant neuromuscular junction, fragmented postsynaptic compartment with no axon profile, completely denervated neuromuscular junction. (B) Partially vacant neuromuscular junction (remodelled neuromuscular junction in which the axon terminal innervates some but not all of its fragmented gutters). (C) Reinnervated neuromuscular junction, the axon terminal innervates four isolated synaptic cups probably originating from the fragmentation of a single neuromuscular junction. (D) Normal neuromuscular junction (control patient), presence of a terminal axon ending as a fork made of thin branches, innervating a well-circumscribed postsynaptic apparatus.

et al., 2010). As shown by ALSFRS-R score and muscle testing values, patients of both groups were similarly and moderately disabled at the time of the biopsy, but patients with rapidly progressive ALS showed significantly less compensatory reinnervation in muscle. All patients were prospectively followed up after muscle biopsy and the two groups showed a strikingly different disease progression (3.018 units/month in the rapidly progressive ALS group and -0.001 units/month in the long-term ALS survivors group, the slightly negative mean disease progression rate in this group reflecting daily fluctuations in function usually based on tiredness or spasticity). It is noteworthy that we did not observe normal neuromuscular junctions in patients with ALS of either

group. Thus, slow functional decline is correlated with the ability of long-term survivors to maintain a successful compensatory response to denervation. Identification of factors that promote compensatory reinnervation in these patients is of great importance as it may provide new targets for therapeutic intervention. We investigated whether this greater reinnervation is associated with differential expression of key muscle factors involved in the reinnervation process. In ALS mice, muscle *Hdac4* and its regulator *Mir206* were recently suggested to play a key role in compensatory reinnervation (Williams *et al.*, 2009). HDAC4 is an important mediator of the action of neural activity on muscle gene expression and its muscle expression is dramatically induced in response

Table 2 Classification of neuromuscular junctions observed by confocal microscope in muscle specimens of patients with ALS

	Patients with rapidly progressive ALS (n = 5)	Long-term ALS survivors (n = 4)	P-value*
Total neuromuscular junctions examined	120	108	
Vacant n(%)	35 (29.2)	10 (9.2)	0.0004
Partially vacant n(%)	41 (34.1)	38 (35.2)	NS
Reinnervated n(%)	44 (36.7)	60 (55.6)	0.006
Normal n(%)	0 (0)	0 (0)	

Innervation status could be determined for 9 of 11 patients with ALS (five in the rapidly progressive ALS group and four in the long-term survivors group). In two patients (one from each group) no neuromuscular junctions were present in the muscle fragment submitted to morphological analysis under the confocal microscope. All neuromuscular junctions observed in each biopsy specimen were analysed and classified into four categories: normal, vacant (fragmented and dispersed synaptic gutters with evanescent borders and absence of nerve terminal profiles, completely denervated neuromuscular junction), partially vacant (remodelled neuromuscular junctions in which the axon terminal innervates some but not all of its fragmented gutters), and reinnervated neuromuscular junctions (abnormally flattened and fragmented synaptic gutters made of separated cups with evanescent borders and one of the following patterns of reinnervation: preterminal sprouting, terminal sprouting, reinnervation with a single axon terminal innervating several cups with branching or without branching 'en passant' innervation). Innervated neoformed neuromuscular junctions were also classified in the reinnervated neuromuscular junctions group (Fig. 2 and Supplementary Fig. 1).

*Alpha level is set at 0.017 (Bonferroni correction). NS = not significant.

to denervation and in ALS mice (Cohen *et al.*, 2007). Taken together, patients with ALS exhibited limited increase in muscle *HDAC4* messenger RNA levels compared with controls. Our results are consistent with a previous report of *HDAC4* induction in muscles of patients with ALS, where fold-change ratios ranged from 1.39 in patients with no muscle function impairment to 2.10 in patients with substantial decrease in muscle function (Pradat *et al.*, 2012). *HDAC4* transcript upregulation was significantly greater in patients with rapidly progressive ALS and correlated positively with disease progression rate during follow-up. Furthermore, we found a robust negative correlation between *HDAC4* protein level and the extent of reinnervation observed on muscle biopsies. Our results thus provide strong arguments for a negative role of muscle *HDAC4* upregulation on the reinnervation process in patients with ALS. These results are in agreement with a previous report of a mouse model with selective deletion of *Hdac4* in skeletal muscle (Williams *et al.*, 2009). In this mouse model, mutant muscles were reinnervated more rapidly than those of controls after nerve injury, confirming the negative influence of *HDAC4* upon reinnervation.

We observed a positive correlation between muscle *HDAC4* transcript levels and induction levels of *CHRNA1* and *CHRNA2*, which are considered as markers of denervation because of the re-expression of the receptor foetal isoform throughout denervated muscle fibres (Gattenlohner *et al.*, 2002). Denervation is a major cause of muscle atrophy in ALS. However, morphometric analysis showed no significant difference between the two groups in terms of mean fibre size and fibre atrophy. This suggests that the higher induction of *HDAC4* observed in patients with rapidly

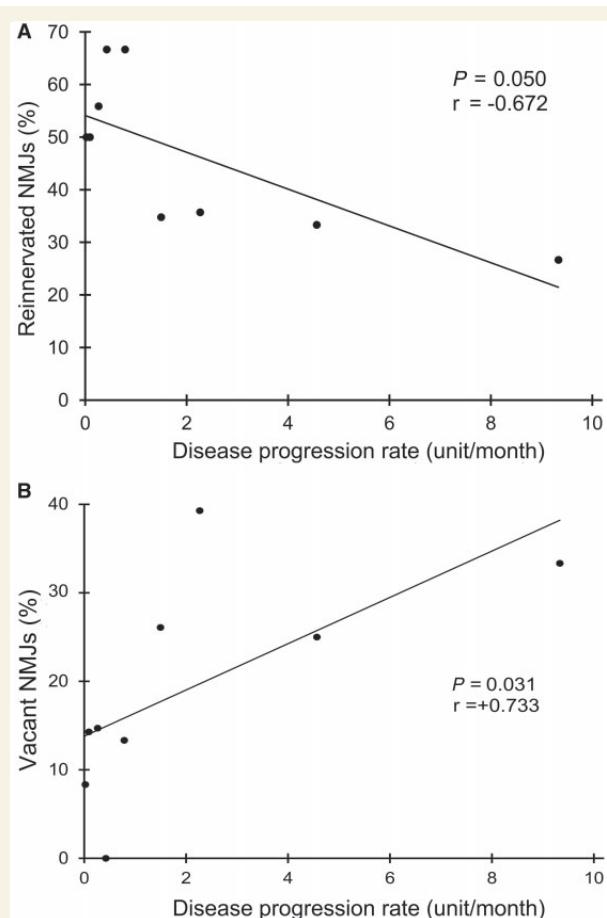


Figure 3 Spearman rank test correlation between innervation status and disease progression rate during follow-up after biopsy. (A) Disease progression rate correlated negatively with the proportion of reinnervated neuromuscular junctions (Spearman rank correlation $r = -0.672$). (B) Disease progression rate correlated positively with the proportion of completely denervated (vacant) neuromuscular junctions (Spearman rank correlation $r = 0.733$). NMJ = neuromuscular junction.

progressive ALS may not be only a correlate of a higher muscle denervation stage.

Finally, the levels of the *HDAC4* regulator *MIR206* and of *FGFBP1* transcripts did not correlate with disease progression or with the extent of reinnervation determined on muscle specimens. *MIR206* and *FGFBP1* induction levels were significantly upregulated in patients with ALS and positively correlated with each other, but not with *HDAC4* transcript or protein content level.

Altogether, our data strongly suggest that *HDAC4* is a deleterious factor for muscle reinnervation in patients with ALS. Further studies are needed to elucidate the way *HDAC4* acts negatively on the reinnervation process. Muscle *HDAC4* may, in addition, directly contribute to muscle dysfunction in patients with ALS. Indeed, *HDAC4* has been shown to inactivate muscle transcription factor myocyte enhancer factor 2 and can therefore repress muscle structural gene expression, which may lead to prominent contractile defects (Cohen *et al.*, 2009). Muscle *HDAC4* may thus

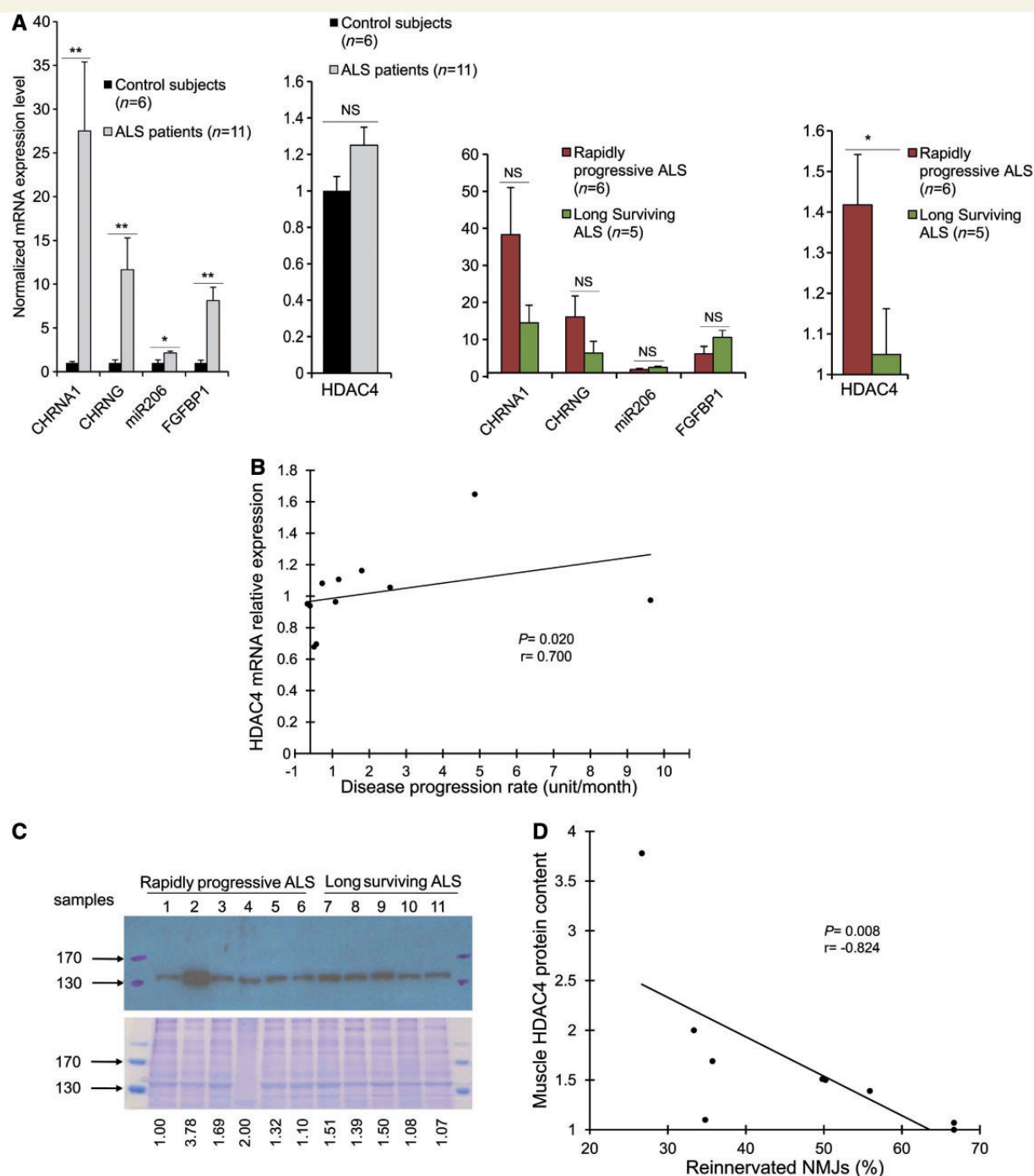


Figure 4 HDAC4 muscle induction is greater in patients with rapidly progressive ALS, correlates with disease progression and negatively influences reinnervation. (A) Relative transcript levels of $\alpha 1$ (*CHRNA1*) and γ (*CHRNA1*) subunits of nicotinic acetylcholine receptor, *MIR206*, *FGFBP1* and *HDAC4* were quantified by reverse transcription quantitative real-time PCR. The y-axis represents relative transcript levels with control values set to 1. Genes used for normalization were $\beta 2$ -microglobulin, *HPRT1* and *ACTB*. All the quantitative PCR primers used are listed in Supplementary Table 1. Data are expressed as mean fold-change ratios (\pm SEM) from two experiments. Mean values from the two experiments are presented for each individual in Supplementary Fig. 2. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ by Mann-Whitney U-tests. NS = not significant. (B) Positive correlation between muscle *HDAC4* messenger RNA relative expression and disease progression rate during follow-up after biopsy (Spearman rank correlation $r = 0.700$). Data shown are representative of two experiments with similar results. (C) Determination of HDAC4 muscle protein content. *Top*: Western blot analysis of the expression of HDAC4 protein in patients with rapidly progressive ALS (numbered from 1 to 6) and long-term ALS survivors (numbered from 7 to 11). *Middle*: Coomassie blue staining as loading control. *Bottom*: HDAC4 relative protein content was determined by the optical density of the HDAC4 bands normalized to the Coomassie staining (arbitrary units). These values were used for Fig. 4D. (D) Negative correlation between HDAC4 protein level and the proportion of reinnervated neuromuscular junctions (Spearman rank correlation $r = -0.824$).

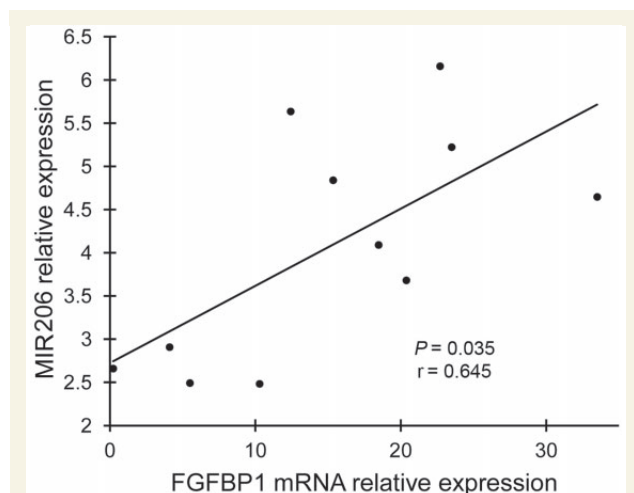


Figure 5 Spearman rank test correlation between MIR206 relative expression and FGFBP1 messenger RNA relative expression (Spearman rank correlation $r = 0.645$). Data shown are representative of two experiments with similar results.

be a potential new target for future treatments. Consistently, trichostatin A, one of the most potent HDAC inhibitors, has recently been shown to delay disease progression and to increase survival when administered to ALS mice after disease onset (Yoo and Ko, 2011). Interestingly, trichostatin A administration increased the number of fully innervated neuromuscular junctions and reduced muscle atrophy. Inhibition of muscle HDAC4 by specific inhibitors could then be a promising therapeutic approach to enhance motor performance and slow disease progression in patients with ALS.

Acknowledgements

We thank all the patients who have participated in this study as well as their relatives. The study was conducted at the Neurosciences Clinical Research Centre (INSERM, CIC-9503), Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, program “Investissements d’avenir” ANR-10-IAIHU-06); the Association Française pour la Recherche sur la SLA (ARSLA, AO 2007 - NETALS), the Association Française contre les Myopathies (AFM, AO 2008 - n°13501) and a “contrat d’interface” Inserm/APHU to G.B.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

Ben Ammar A, Soltanzadeh P, Bauché S, Richard P, Goillot E, Herbst R, et al. A mutation causes MuSK reduced sensitivity to agrin and congenital myasthenia. *PLoS One* 2013; 8: e53826.

- Bromberg MB, Forsheve DA, Nau KL, Bromberg J, Simmons Z, Fries TJ. Motor unit number estimation, isometric strength, and electromyographic measures in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 1993; 16: 1213–9.
- Brooke MH, Kaiser KK. Some comments on the histochemical characterization of muscle adenosine triphosphatase. *J Histochem Cytochem* 1969; 17: 431–2.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000; 1: 293–9.
- Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d’atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antéro-latéraux de la moelle épinière. *Arch Physiol Neurol Pathol* 1869; 2: 744–60.
- Cöers C. Morphologie de la jonction neuromusculaire. *Arch Biol (Liège)* 1964; 75: 905–41.
- Cohen TJ, Barrientos T, Hartman ZC, Garvey SM, Cox GA, Yao TP. The deacetylase HDAC4 controls myocyte enhancing factor-2-dependent structural gene expression in response to neural activity. *FASEB J* 2009; 23: 99–106.
- Cohen TJ, Waddell DS, Barrientos T, Lu Z, Feng G, Cox GA, et al. The histone deacetylase HDAC4 connects neural activity to muscle transcriptional reprogramming. *J Biol Chem* 2007; 282: 33752–9.
- Donahue SP, Wood JG, English AW. On the role of the 200-kDa neurofilament protein at the developing neuromuscular junction. *Dev Biol* 1988; 130: 154–66.
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* 2000; 20: 2534–42.
- Gattenlohner S, Schneider C, Thamer C, Klein R, Roggendorf W, Gohlke F, et al. Expression of foetal type acetylcholine receptor is restricted to type 1 muscle fibres in human neuromuscular disorders. *Brain* 2002; 125: 1309–19.
- Hansen S, Ballantyne JP. A quantitative electrophysiological study of motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1978; 41: 773–83.
- Huzé C, Bauche S, Richard P, Chevessier F, Goillot E, Gaudon K, et al. Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 155–67.
- Johnson MA, Polgar J, Weightman D, Appleton D. Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. *J Neurol Sci* 1973; 18: 111–29.
- Koelle GB, Friedenwald JA. A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949; 70: 617–22.
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. Lancet* 1996; 347: 1425–31.
- Le Bozec S, Maton B. Differences between motor unit firing rate, twitch characteristics and fibre type composition in an agonistic muscle group in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1987; 56: 350–5.
- Maselli RA, Mass DP, Distad BJ, Richman DP. Anconeus muscle: a human muscle preparation suitable for in-vitro microelectrode studies. *Muscle Nerve* 1991; 14: 1189–92.
- Maselli RA, Wollman RL, Leung C, Distad B, Palombi S, Richman DP, et al. Neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 1993; 16: 1193–203.
- Mateen FJ, Carone M, Sorenson EJ. Patients who survive 5 years or more with ALS in Olmsted County, 1925–2004. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81: 1144–6.
- McComas AJ, Galea V, de Bruin H. Motor unit populations in healthy and diseased muscles. *Phys Ther* 1993; 73: 868–77.
- Nelson LM. Epidemiology of ALS. *Clin Neurosci* 1995; 3: 327–31.
- Pradat PF, Dubourg O, de Tapia M, di Scala F, Dupuis L, Lenglet T, et al. Muscle gene expression is a marker of amyotrophic lateral sclerosis severity. *Neurodegener Dis* 2012; 9: 38–52.
- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 2006; 9: 408–19.

- Saltin B, Gollnick PD. Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In: Peachey LD, Adrian RH, Geiger SR, editors. *Handbook of physiology*. Bethesda: American Physiological Society; 1983. p. 555–631.
- Schaefer AM, Sanes JR, Lichtman JW. A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol* 2005; 490: 209–19.
- Turner MR, Parton MJ, Shaw CE, Leigh PN, Al Chalabi A. Prolonged survival in motor neuron disease: a descriptive study of the King's database 1990–2002. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 995–7.
- van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest* 2007; 117: 2369–76.
- Weber M, Neuwirth C, Thierbach J, Schweikert K, Czaplinski A, Petersen J, et al. ALS patients with SOD1 mutations in Switzerland show very diverse phenotypes and extremely long survival. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 351–3.
- Williams AH, Valdez G, Moresi V, Qi X, McAnally J, Elliott JL, et al. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* 2009; 326: 1549–54.
- Yoo YE, Ko CP. Treatment with trichostatin A initiated after disease onset delays disease progression and increases survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2011; 231: 147–59.
- Zoccolella S, Beghi E, Palagano G, Fraddosio A, Guerra V, Samarelli V, et al. Predictors of long survival in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J Neurol Sci* 2008; 268: 28–32.

PUBLICATION N°2 : CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DE LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE SLA

1. Résumé

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une pathologie neurodégénérative touchant les motoneurones, dont l'origine n'est pas connue. Le seul traitement actuellement disponible est le riluzole qui ne permet qu'un allongement modeste de la survie. Les données de la littérature, obtenues à partir de modèles animaux, sont en faveur de la survenue d'anomalies morphologiques précoces des jonctions neuromusculaires (JNM) dans la pathogénie de la SLA. Des altérations fonctionnelles de la JNM ont également été rapportées chez les patients atteints de SLA mais leur origine physiopathologique n'est pas connue. Une meilleure connaissance des phénomènes en cause pourrait déboucher sur de nouveaux axes thérapeutiques. Dans cette étude, nous avons analysé la morphologie des JNM chez 5 patients atteints de SLA au stade précoce de la maladie (durée médiane d'évolution = 10 mois) et 4 patients présentant une survie prolongée (durée médiane d'évolution = 100 mois, "survivants à long-terme"), en associant étude topographique en microscopie confocale et analyse ultrastructurale. L'analyse fonctionnelle des JNM était réalisée, en enregistrement de surface, par la recherche d'un décrement de l'amplitude de la réponse motrice après stimulation nerveuse répétitive à 3Hz, en faveur d'une anomalie de transmission neuromusculaire. Des altérations morphologiques des JNM étaient visibles chez tous les patients, y compris au stade précoce de la maladie. Associé aux anomalies en rapport avec le phénomène de dénervation, nous avons observé un aspect anormal de spiculation du bord extérieur de la gouttière primaire au niveau de 33,5% des JNM. Cet aspect était plus fréquent chez les patients ayant une survie prolongée, et pourrait être en rapport avec des épisodes itératifs de dénervation et de réinnervation. Un aspect typique de réinnervation était visible au niveau de 56,8% de l'ensemble des JNMs innervées avec de fréquents bourgeonnements collatéraux ("sprouting", en moyenne 1,02 bourgeons par axone). L'arborisation terminale était souvent peu ramifiée (en moyenne 1,10 branches de division de 1er ordre), possiblement en rapport avec une "immaturité" des JNM réinnervées. Comme classiquement observé après dénervation, des prolongements cytoplasmiques étaient souvent visibles au niveau des cellules de Schwann terminales. En moyenne, chaque cellule de Schwann terminale émettait 2,22 prolongements et contactait 1,90 éléments postsynaptiques. Une interposition marquée de la cellule de Schwann terminale entre la terminaison nerveuse et la membrane postsynaptique, susceptible d'altérer

la transmission synaptique, était parfois visible. Après stimulation nerveuse répétitive, 6/9 patients présentaient un décrétement d'amplitude de la réponse motrice mesurée sur le muscle biopsié ou sur un muscle de la même région. L'amplitude du décrétement était inversement corrélée avec la proportion de JNM réinnervées au sein du muscle. Nos résultats montrent que des anomalies majeures des JNM sont présentes chez les patients atteints de SLA, y compris au stade précoce de la maladie. Des travaux complémentaires sont maintenant nécessaires afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués. Ces altérations pourraient jouer un rôle dans l'atteinte fonctionnelle motrice présentée par les patients et représenter des cibles thérapeutiques potentielles.

2. Publication n°2: A comprehensive study of neuromuscular junction morphology in patients with amyotrophic lateral sclerosis: major structural alterations are present from the early stage of the disease

(soumis)

Acta Neuropathologica

A comprehensive study of neuromuscular junction morphology in patients with amyotrophic lateral sclerosis: major structural alterations are present from the early stage of the disease

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	A comprehensive study of neuromuscular junction morphology in patients with amyotrophic lateral sclerosis: major structural alterations are present from the early stage of the disease
Article Type:	Original Paper
Keywords:	Amyotrophic lateral sclerosis; motor neuron; neuromuscular junction; innervation; terminal Schwann cell.
Corresponding Author:	Gaelle Bruneteau, M.D. Hôpital Pitié-Salpêtrière Paris, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Hôpital Pitié-Salpêtrière
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Gaelle Bruneteau, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Gaelle Bruneteau, M.D.
	Stéphanie Bauché
	Guy Brochier
	Nathalie Mandjee
	Marie-Laure Tanguy
	Anthony Behin
	Frédéric Khiami
	Elhadi Sariali
	Caroline Hell-Remy
	François Salachas
	Pierre-François Pradat
	Lucette Lacomblez
	Bertrand Fontaine
	Michel Fardeau
	Vincent Meininger
	Emmanuel Fournier
	Jeanine Koenig
	Daniel Hantai
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Data from mouse models suggest early changes in both neuromuscular junction (NMJ) morphology and function in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Impairment of

neuromuscular transmission has also been reported in ALS patients but the underlying pathophysiological basis remains unknown. We used confocal and electron microscopy to study NMJ morphology in muscle samples collected from five early-stage ALS patients and four long-term survivors (disease duration > 5 years). Muscle response to repetitive nerve stimulation was used to search for functional alteration of the NMJ (i.e. decremental response). We found significant alterations in NMJ morphology in all ALS patients. We quantified sprouting, branching of the terminal axonal arborization, and determined the number of cytoplasmic processes for each terminal Schwann cell (TSC). The terminal axonal arborization was usually sparsely branched and 56.8% of innervated NMJs showed a typical reinnervation pattern. A third of the NMJs presented abnormal spike-like areas of the outer edge of the postsynaptic primary gutter. This pattern was more frequent in long-term survivors and could be associated with recurrent episodes of denervation/reinnervation. Consistently, TSC morphology was altered with extensive cytoplasmic processes. Marked intrusion of the TSC in the synaptic cleft was seen in some cases. 6/9 patients presented a decremental response of the biopsied or a neighbouring muscle after repetitive nerve stimulation. A greater decrement correlated with a lower proportion of reinnervated NMJs. Our results support the hypothesis that morphological alterations of NMJs are present from early-stage disease and may significantly contribute to functional motor impairment in ALS. Targeting this aspect of neurodegeneration may thus constitute a potential therapeutic approach.

**A comprehensive study of neuromuscular junction morphology in patients with
amyotrophic lateral sclerosis: major structural alterations are present from the early
stage of the disease**

Gaëlle Bruneteau^{1,2,3,4}, Stéphanie Bauché^{2,3}, Guy Brochier^{5,6}, Nathalie Mandjee^{2,3}, Marie-Laure Tanguy⁷, Anthony Behin⁶, Frédéric Khiami⁸, Elhadi Sariali⁸, Caroline Hell-Remy⁹, François Salachas¹, Pierre-François Pradat¹, Lucette Lacomblez^{1,3,10}, Bertrand Fontaine^{2,3}, Michel Fardeau⁵, Vincent Meininger¹, Emmanuel Fournier^{2,6}, Jeanine Koenig^{2,3} and Daniel Hantai^{2,3,6}.

¹ APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Département des Maladies du Système Nerveux, Centre référent SLA, Paris, France;

² INSERM-CNRS UMR 1127-7225, Institut Cerveau Moelle-ICM, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France;

³ Université Pierre et Marie Curie, Paris, France;

⁴ APHP, INSERM, ICM, Centre d'Investigation Clinique Pitié Neurosciences, CIC-1422, Département des Maladies du Système Nerveux, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France;

⁵ Unité de Morphologie Neuromusculaire, Institut de Myologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France;

⁶ APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, centre de référence de pathologie neuromusculaire Paris-Est, Institut de Myologie, Paris, France;

⁷ AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Unité de Recherche Clinique, Paris, France;

⁸ APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service d'Orthopédie, Paris, France;

⁹ APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Département d'Anesthésie-Réanimation, Paris, France;

¹⁰ INSERM U1146, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale, Paris, France.

Address for correspondence:

Dr Gaëlle BRUNETEAU, Département de Neurologie, centre référent SLA

Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47-83 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France

Phone: +33 142 162471

Fax: +33 142 162473

E-mail: gaelle.bruneteau@psl.aphp.fr

Abstract

Data from mouse models suggest early changes in both neuromuscular junction (NMJ) morphology and function in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Impairment of neuromuscular transmission has also been reported in ALS patients but the underlying pathophysiological basis remains unknown. We used confocal and electron microscopy to study NMJ morphology in muscle samples collected from five early-stage ALS patients and four long-term survivors (disease duration > 5 years). Muscle response to repetitive nerve stimulation was used to search for functional alteration of the NMJ (i.e. decremental response). We found significant alterations in NMJ morphology in all ALS patients. We quantified sprouting, branching of the terminal axonal arborization, and determined the number of cytoplasmic processes for each terminal Schwann cell (TSC). The terminal axonal arborization was usually sparsely branched and 56.8% of innervated NMJs showed a typical reinnervation pattern. A third of the NMJs presented abnormal spike-like areas of the outer edge of the postsynaptic primary gutter. This pattern was more frequent in long-term survivors and could be associated with recurrent episodes of denervation/reinnervation. Consistently, TSC morphology was altered with extensive cytoplasmic processes. Marked intrusion of the TSC in the synaptic cleft was seen in some cases. 6/9 patients presented a decremental response of the biopsied or a neighbouring muscle after repetitive nerve stimulation. A greater decrement correlated with a lower proportion of reinnervated NMJs. Our results support the hypothesis that morphological alterations of NMJs are present from early-stage disease and may significantly contribute to functional motor impairment in ALS. Targeting this aspect of neurodegeneration may thus constitute a potential therapeutic approach.

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis, motor neuron, neuromuscular junction, innervation, terminal Schwann cell

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disorder involving motor neurons of the cerebral cortex, brain stem and spinal cord, usually leading to death in 3-5 years [3, 9]. The cause of the disease is unknown and about 90% of ALS cases are sporadic. The remaining 10% are familial cases among which 20% can be attributed to a mutation in the superoxide dismutase (SOD1) gene. Several lines of evidence suggest early and selective changes in neuromuscular junctions (NMJs) in ALS. Studies using transgenic mice expressing mutations in the SOD1 gene have shown that NMJ degeneration occurs in the early stages of disease progression. Pathological studies of SOD1^{G93A} mutant mice at multiple time points during the disease course showed that denervation of NMJs is significant far before the appearance of first pathological changes in the motor neurons [16, 41]. Selective loss of fast fatigable neuromuscular synapses and resistance of slow-type synapses, which retained high sprouting competence, were also reported in SOD1^{G93A} and SOD1^{G85R} mutant mice [19, 35]. Microelectrode recordings in SOD1 mutant mice [32, 36] showed that neuromuscular transmission (NMT) was enhanced before onset of motor symptoms, possibly as a compensatory response to early denervation [36]. At the early symptomatic stage, neurotransmission impairment was observed [32] and seemed to relate to a specific sub-population of NMJs [36].

Various studies using surface recording of compound motor action potentials (CMAPs) after repetitive nerve stimulation (RNS) at slow stimulus rate suggested impairment of NMT in ALS patients [14, 20, 24, 42, 44]. Two *ex vivo* microelectrophysiological studies performed in ALS patients also showed results consistent with NMT dysfunction [21,29], but there are few ultrastructural studies of motor end-plates in ALS patients [4, 5, 37, 40, 45] and the

morphological characteristics of NMJs in ALS remain largely unknown. In a previous study, we reported that long-term survival and functional motor preservation over time in ALS were associated with greater compensatory reinnervation of NMJs [7]. Characterizing the morphological changes of NMJs in ALS patients could help to identify new mechanisms involved in the pathophysiology of the disease and potential new targets for future treatments. Using confocal and electron microscopy, we performed a comprehensive study of the structure of the NMJ in five early-stage ALS patients and four long-term survivors, and correlated the morphological results with electrophysiological and clinical data.

Materials and methods

Patients and controls

The nine patients were enrolled in a study performed between March 2009 and July 2013. The study was approved by the local ethics committee and all patients provided written informed consent according to institutional guidelines. All patients met the El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of definite, probable or possible ALS [6]. With the patients' written informed consent, genetic screening was performed for mutations in the SOD1, TARDBP and FUS genes, and for the GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in the C9ORF72 gene. All patients were prospectively followed up every 3 months after muscle biopsy. Functional impairment was assessed using the revised ALS Functional Rating Scale (ALSFRS-R) which rates the performance of activities of daily living, with scores from 0 (total disability) to 48 (no disability) [8]. Disease progression rate during follow-up was calculated for each patient:

$$(\text{ALSFRS-R score at "time of biopsy"} - \text{ALSFRS-R score at "last follow-up"}) / \text{follow-up duration after biopsy}$$

Motor-point muscle biopsy procedure

For 3 patients, muscle specimens were taken from the anconeus muscle, under regional anaesthesia, using the technique described by Maselli and colleagues [28, 29]. For 6 patients, muscle samples were removed from the deltoid muscle by open biopsy under local anaesthesia. The NMJ region was determined by the small twitch provoked by the tip of the scalpel on the surface of the muscle fascicles.

Confocal imaging analysis of NMJs

The presence of NMJs was confirmed on a longitudinal strip of the specimen using the classic Koelle method revealing cholinesterase activity [25]. The specimens were observed by confocal microscopy (Carl Zeiss LSM510, Oberkochen, Germany). After fixation with 4% paraformaldehyde, whole mounts of muscle specimens were stained for acetylcholine receptors (AChRs) with rhodamine-conjugated α -bungarotoxin (1/500, tetramethylrhodamine α -bungarotoxin, Molecular Probes, Invitrogen, Saint Aubin, France). For staining of axons, the following primary antibodies were used: 168 kDa neurofilament antibody (1/250, 2H3, Hybridoma Bank, Iowa City, Iowa), 200 kDa neurofilament antibody (1/250, Chemicon, Billerica, Massachusetts) and 68 kDa neurofilament antibody (1/100, Abcam, Cambridge, Massachusetts). Terminal Schwann cells (TSCs) were revealed by anti-S100 polyclonal antibody (1/50, Polyclonal Rabbit S100, Dako, Les Ulis, France).

Electron microscopy

Muscle samples were fixed in a mixture of paraformaldehyde 2% and glutaraldehyde 2.5% in 0.12 M phosphate buffer (pH 7.4). Samples were post-fixed with osmium tetroxide (2%) in sodium cacodylate buffer, dehydrated and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections (80 nm) were contrasted with uranyl acetate followed by Reynolds lead citrate and viewed in a

Philips CM120 transmission electron microscope. Digital images were taken with a Morada CCD camera.

Surface-recorded neurotransmission studies

Surface-recorded studies of NMT were performed at the time of inclusion. The RNS test at slow stimulus rate (10 stimuli at 3 Hz) was performed at room temperature, bilaterally on the spinal accessory nerve (recording electrode over the upper trapezius muscle), the ulnar nerve (recording electrode over the hypothenar muscle), the radial nerve (recording electrode over the anconeus muscle), the deep peroneal nerve (recording electrode over the tibialis anterior muscle), and the cranial nerves V and XII (recording electrode over the submandibular region). For each train of repetitive stimuli, the amplitudes of the first and fifth CMAPs were compared, and the resulting decrement of the latter (if present) was expressed as a percentage. In clinical practice, a difference greater than 10% is considered to indicate neurotransmission impairment [1]. Short exercise tests were performed according to the technique described by Fournier and colleagues [17]. CMAPs were recorded on the hypothenar muscle after stimulation of the ulnar nerve at the wrist and on the plantar flexor muscles after stimulation of the posterior tibial nerve at the ankle. CMAPs were recorded at rest, and immediately after a maximal voluntary contraction of the muscle in isometric conditions during 30 seconds. The procedure was repeated three times for each nerve. A post-exercise increment greater than 20% was considered abnormal, suggesting presynaptic dysfunction.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with XLSTATS 2012 software (Addinsoft, Paris, France) and SAS software version 8.2 (SAS Institute, Cary, North Carolina). We used the Mann-Whitney U test to compare continuous data. Correlations between CMAP variation during RNS and CMAP amplitude at rest were analyzed with a linear mixed model for correlated

data. We used a linear mixed model for correlated data and a generalized linear mixed model for correlated data to compare the morphological modifications of the NMJs between ALS long-term survivors and rapidly progressive ALS patients. Correlations between morphological, electrophysiological and clinical data were analyzed using the nonparametric Spearman rank correlation test. All statistics were two-tailed and the level of significance was set at $P=0.05$.

Results

Characteristics of ALS patients

Nine patients were included in this study (Table 1). All patients were treated with riluzole. Median disease duration at the time of the biopsy was 10 months for five patients with early-stage ALS. Median disease duration was 100 months for four patients who had more than 5 years of disease progression without requiring respiratory support or gastrostomy feeding and met the definition for long-term ALS survivors [30].

Major morphological alterations of the NMJs are present in all ALS cases

Postsynaptic apparatus morphology

The postsynaptic apparatus was abnormal in all ALS patients for almost all detectable NMJs (n=430) observed under confocal microscopy (Fig. 1). Denervation-induced modifications included enlargement, fragmentation and flattening of the postsynaptic apparatus. In some NMJs, staining of AChRs was barely detectable, usually in the case of complete denervation. Furthermore, the outer edge of the postsynaptic primary gutter of some NMJs seemed to present spike-like areas, revealed by AChR labelling (Fig. 2). This appearance, which we will refer to as "spicules", was visible in 33.5% of NMJs. Depending on the degree of

fragmentation, this pattern ranged from a fragmented spiculated gutter to isolated spiculated cups. The frequency of spiculated NMJs differed markedly from one patient to another (Table 2). The proportion of spiculated NMJs was higher in long-term survivors (43.2%) than in the early-stage ALS group (26.1%), but this difference did not reach significance ($P = 0.34$). Laser scanning confocal microscopy yields three-dimensional volumetric data which are stored as stack of two-dimensional images. From these "stacks", we used ImageJ software to perform three-dimensional surface reconstructions of spiculated NMJs. On these reconstructions, the spicules mainly extended laterally from the edge of the synaptic gutter (or cup) (Fig. 3). On ultrastructural examination (Fig. 4), the synaptic gutter was usually flattened, often with well-preserved subneural folds. The presence of AChRs was identified as a dark, electron-opaque, border on the crests of the subneural folds. In some NMJs, this dark border seemed to extend to an immediately adjacent, unfolded, portion of the postsynaptic membrane.

Quantitative and qualitative analysis of innervation

Of 228 NMJs analyzed (Fig. 5), 45 (19.7%) were completely denervated (i.e. fragmented synaptic gutters and absence of nerve terminal profile). Among the remaining 183 innervated NMJs, 79 (43.2%) were "remodelled" NMJs in which the axon terminal partially innervated a flattened, fragmented postsynaptic apparatus. One hundred and four NMJs (56.8%) were reinnervated (i.e. NMJs associating a flattened and fragmented postsynaptic apparatus and one of the following patterns of reinnervation: nodal, preterminal or ultraterminal sprouting, reinnervation with a single axon terminal innervating several cups with or without branching). Detailed data relating to the quantitative analysis of reinnervation have already been reported elsewhere [7].

We then studied the morphology of all innervated NMJs in which innervation characteristics could be determined (n=107). Normal NMJs, with a normal postsynaptic apparatus facing a normal terminal arborization, were not seen. For each innervated NMJ, we determined the following parameters: number of axons per NMJ, number of first-order branches of the terminal arborization and number of sprouts (regrouping nodal, preterminal and ultraterminal sprouts) per axon (Table 2). Each NMJ was usually singly innervated, but some NMJs, particularly in the long-term ALS survivors, were polyinnervated. The number of axons per NMJ correlated positively with disease duration ($P = 0.025$, $r = 0.749$) and negatively with disease progression rate ($P = 0.031$, $r = -0.730$). Each terminal axon gave rise to a mean of 1.02 sprouts. The mean number of first-order branches of the terminal arborization was 1.10 and correlated negatively with the proportion of reinnervated NMJs ($P = 0.050$, $r = -0.681$). Innervation characteristics were similar in both ALS groups (Table 2).

Terminal Schwann cell alterations

We analyzed the TSC morphology of 51 NMJs (Table 2, Fig. 6). TSC extended a mean 2.22 processes and contacted a mean 1.90 postsynaptic elements. TSC alterations were similar in both ALS groups. On electron micrographs, TSCs normally "capped" the nerve terminal in some NMJs (Fig. 4a and 4c), but in others a marked interposition of the TSC between the axon terminal and the postsynaptic membrane could be observed, which was sometimes so pronounced that only a small part of the synaptic surface was accessible for neuromuscular transmission (Fig. 7). Multiple layers of TSC basal lamina were often visible near the primary synaptic cleft (Fig. 4a and 4d).

Neuromuscular transmission impairment

Detailed results of RNS studies are presented Online Resource 1. A decrement of CMAP amplitude was observed in 44/86 nerves after RNS. The size of the decrement correlated negatively with the CMAP amplitude at rest ($P = 0.005$, $\beta = 0.73$). Six patients presented a decremental response measured on the biopsied muscle (for anconeus biopsies, $n = 2$) or on the trapezius muscle of the same shoulder (for deltoid biopsies, $n = 4$) after RNS. In these patients, the size of the decrement correlated negatively ($P = 0.033$, $r = -0.851$) with the proportion of reinnervated NMJs observed in the muscle sample. No other correlation was observed between the decrement amplitude and the morphological features of NMJs. Finally, three patients (33%, including two long-term ALS survivors) showed a marked CMAP decrement, greater than 10%, in at least one muscle/nerve combination. In these patients, the size of the decrement ranged from 16 to 26% (mean 20%). During short exercise tests, immediate post-exercise abnormal facilitation (reflecting presynaptic alterations of NMT) was not detected.

Discussion

In this work we showed that major alterations of NMJ morphology were present in all our ALS patients, affecting the three main components of the NMJ: the postsynaptic apparatus, the axon terminal and the TSC. These alterations were seen both in long-term survivors and in early-stage ALS patients, confirming in humans the validity of studies performed in animal models showing that NMJ degeneration occurs early in the disease process [16, 41].

Denervation-induced modifications with fragmentation and flattening of the postsynaptic apparatus, and reduced innervation with fairly well-preserved secondary synaptic clefts have already been described in ALS patients [4, 12, 40, 45]. Our study also confirms the

importance of compensatory reinnervation in ALS [11, 15, 43] with more than half of innervated NMJs showing a characteristic reinnervation pattern. Relating to the collateral reinnervation process, some NMJs were polyinnervated, correlating with higher disease duration and lower progression rate. The terminal axonal arborization was usually sparsely branched, possibly related to "immaturity" of reinnervated NMJs. Consistently, the mean number of first-order branches per axon at a given NMJ correlated inversely with the proportion of reinnervated NMJs.

Other morphological modifications have not been reported, to date, in ALS. After staining of AChR, we observed by confocal microscopy a spiculated appearance of the outer edge of the postsynaptic apparatus in 33.5% of NMJs. There is only one previous confocal microscopy study of NMJs in ALS patients [27], in which NMJs appeared much more denervated in limb muscles than in extraocular muscles (which typically are spared clinically) at end stage, but the morphological characteristics of NMJs were not determined. On our three-dimensional reconstructions of NMJs performed using stacks of confocal microscopy images, these spicules seemed to arise mainly laterally from the edge of the synaptic gutter, as if AChRs were present on the muscle membrane immediately adjacent to this residual synaptic gutter. Consistent with this observation, ultrastructural examination of some NMJs showed that the dark border corresponding to the presence of AChRs extended to the muscle membrane closely adjacent to the primary gutter. After denervation, junctional AChRs persist for several weeks [18, 26], but their distribution is similar to that in normally innervated muscles (only on top of the junctional folds) [2]. Moreover, we did not observe spiculated NMJs in other diseases with known functional denervation, as congenital myasthenic syndromes, analyzed by confocal imaging [10, 22, 23]. It is therefore unlikely that the spiculated pattern observed in ALS patients is related to the process of denervation itself, but it could be associated with recurrent episodes of denervation and reinnervation encountered in ALS [31]. Consistently,

there was a tendency for a higher frequency of spiculated NMJs in long-term survivors, and a higher proportion of spiculation was associated with a higher number of postsynaptic elements in contact with each TSC. Following experimental denervation, TSCs of the denervated endplates elaborate extensive cytoplasmic processes which form bridges with neighbouring innervated NMJs, to guide reinnervation. Reinnervation results in a withdrawal of all the processes except those used by the regenerating axon to reinnervate a postsynaptic apparatus [33, 38]. Thus, the number of postsynaptic elements contacted by one TSC will be greater when the NMJs have undergone multiple episodes of denervation followed by reinnervation. In agreement with this hypothesis, accumulation of terminal TSC laminae, which are thought to be a consequence of repeated episodes of expansion/contraction of TSC during the NMJ regeneration process [13], were often visible near the primary synaptic clefts on electron micrographs. However, the results of experimental denervation studies [33, 38] seem to suggest that the postsynaptic elements contacted by a given TSC during the reinnervation process belong to distinct NMJs. In our study, the postsynaptic elements in contact with each TSC were usually not distant enough to belong to different NMJs. Our results thus support the idea of a more distal denervation process than what is observed after experimentally cutting or crushing the nerve, the formation of Schwann cell bridges and the reinnervation process thereby also occurring within the same NMJ.

Finally, we found a decremental response greater than 10% after RNS, indicating NMJ functional alteration in clinical practice [1], in a third of our patients. We did not detect immediate post-exercise facilitation, unlike what is classically observed in disorders with NMJ presynaptic dysfunction [34]. The decremental response in ALS has usually been attributed to NMT dysfunction caused by "immaturity" of newly reinnervated structures [39, 42]. Our results do not favour this hypothesis as a higher magnitude of CMAP decrement correlated with a lower proportion of reinnervated NMJs in the same muscle or a muscle of

the same region. Alternatively, synaptic transmission failure at NMJs undergoing degeneration (which may be either native or formerly reinnervated NMJs) may play a part in decremental responses. As we observed on electron micrographs, abnormal interposition of the TSC in the synaptic cleft may also contribute to NMJ functional alteration and pathological decrement in ALS patients by reducing the synaptic surface available for neurotransmission.

Altogether, our results show that major morphological defects are present in NMJs of ALS patients even at the early stages, and further work is now required to elucidate the molecular mechanisms mediating pre- and postsynaptic pathology. These NMJ alterations may significantly contribute to functional motor impairment and targeting this aspect of neurodegeneration could represent a potential therapeutic approach.

Acknowledgements

We thank all the patients who participated in this study and their relatives. The study was conducted at the Neurosciences Clinical Research Centre (INSERM, CIC-1422), Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris. This work was supported by the Association Française pour la Recherche sur la SLA (ARSLa, AO 2007 - NETALS), the Association Française contre les Myopathies (AFM, AO 2008 - n°13501), the Agence Nationale de la Recherche (ANR, program “Investissements d’avenir” ANR-10-IAIHU-06), and a "Contrat d'interface" Inserm/APHP to GB.

Conflicts of interests

There are no conflicts of interest to declare.

References

1. AAEM (2001) Practice parameter for repetitive nerve stimulation and single fiber EMG evaluation of adults with suspected myasthenia gravis or Lambert-Eaton myasthenic syndrome: summary statement. *Muscle Nerve* 24: 1236-1238
2. Bader D (1981) Density and distribution of alpha-bungarotoxin-binding sites in postsynaptic structures of regenerated rat skeletal muscle. *J Cell Biol* 88: 338-345
3. Beghi E, Mennini T, Bendotti C, Bigini P, Logroscino G, Chio A, Hardiman O, Mitchell D, Swinger R, Traynor BJ, Al-Chalabi A (2007) The heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a possible explanation of treatment failure. *Curr Med Chem* 14: 3185-3200
4. Bjornskov EK, Dekker NP, Norris FH, Jr., Stuart ME (1975) End-plate morphology in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 32: 711-712
5. Bjornskov EK, Norris FH, Jr., Mower-Kuby J (1984) Quantitative axon terminal and end-plate morphology in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 41: 527-530
6. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL (2000) El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1: 293-299
7. Bruneteau G, Simonet T, Bauche S, Mandjee N, Malfatti E, Girard E, Tanguy ML, Behin A, Khiami F, Soriali E, Hell-Remy C, Salachas F, Pradat PF, Fournier E, Lacomblez L, Koenig J, Romero NB, Fontaine B, Meininger V, Schaeffer L, Hantai D (2013) Muscle histone deacetylase 4 upregulation in amyotrophic lateral sclerosis: potential role in reinnervation ability and disease progression. *Brain* 136: 2359-2368
8. Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B, Nakanishi A (1999) The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. *BDNF ALS Study Group (Phase III). J Neurol Sci* 169: 13-21
9. Charcot JM, Joffroy A (1869) Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antéro-latéraux de la moelle épinière. *Arch Physiol* 2: 354-367
10. Chevessier F, Faraut B, Ravel-Chapuis A, Richard P, Gaudon K, Bauche S, Prioleau C, Herbst R, Goillot E, Ioos C, Azulay JP, Attarian S, Leroy JP, Fournier E, Legay C, Schaeffer L, Koenig J, Fardeau M, Eymard B, Pouget J, Hantai D (2004) MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 13: 3229-3240
11. Coërs C (1955) [Histological aspects of neuromuscular regeneration during various diseases of the peripheral motor neuron; collateral regeneration in humans]. *Acta Neurol Psychiatr Belg* 55: 23-30.

12. Coërs C. and Woolf A. L. (1959) The innervation of muscle. A biopsy study. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd
13. Couteaux R, Mira JC, d'Albis A (1988) Regeneration of muscles after cardiotoxin injury. I. Cytological aspects. *Biol Cell* 62: 171-182
14. Denys EH, Norris FH, Jr. (1979) Amyotrophic lateral sclerosis. Impairment of neuromuscular transmission. *Arch Neurol* 36: 202-205
15. Fardeau M (1964) [Simultaneous staining of the terminal motor innervation and the sub-neural apparatus (S. Manolov's technic). Importance for diagnosis in neuromuscular pathology]. *Rev Neurol (Paris)* 111: 501-506
16. Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185: 232-240
17. Fournier E, Arzel M, Sternberg D, Vicart S, Laforet P, Eymard B, Willer JC, Tabti N, Fontaine B (2004) Electromyography guides toward subgroups of mutations in muscle channelopathies. *Ann Neurol* 56: 650-661
18. Frank E, Gautvik K, Sommerschild H (1976) Persistence of junctional acetylcholine receptors following denervation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 40: 275-281
19. Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P (2000) Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* 20: 2534-2542
20. Henderson R, Baumann F, Hutchinson N, McCombe P (2009) CMAP decrement in ALS. *Muscle Nerve* 39: 555-556
21. Highstone HH, Colton RP, Norris FH (1975) Amyotrophic Lateral Sclerosis: changes in motor nerve terminal function. *Recent Advances in Myology* 542-545
22. Huze C, Bauche S, Richard P, Chevessier F, Goillot E, Gaudon K, Ben AA, Chaboud A, Grosjean I, Lecuyer HA, Bernard V, Rouche A, Alexandri N, Kuntzer T, Fardeau M, Fournier E, Brancaccio A, Ruegg MA, Koenig J, Eymard B, Schaeffer L, Hantai D (2009) Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function. *Am J Hum Genet* 85: 155-167
23. Ishigaki K, Nicolle D, Krejci E, Leroy JP, Koenig J, Fardeau M, Eymard B, Hantai D (2003) Two novel mutations in the COLQ gene cause endplate acetylcholinesterase deficiency. *Neuromuscul Disord* 13: 236-244
24. Killian JM, Wilfong AA, Burnett L, Appel SH, Boland D (1994) Decremental motor responses to repetitive nerve stimulation in ALS. *Muscle Nerve* 17: 747-754
25. Koëlle GB, Friedenwald JA (1949) A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 70: 617-622

26. Kumai Y, Ito T, Matsukawa A, Yumoto E (2005) Effects of denervation on neuromuscular junctions in the thyroarytenoid muscle. *Laryngoscope* 115: 1869-1872
27. Liu JX, Brannstrom T, Andersen PM, Pedrosa-Domellof F (2013) Distinct changes in synaptic protein composition at neuromuscular junctions of extraocular muscles versus limb muscles of ALS donors. *PLoS One*. Doi: 10.1371/journal.pone.0057473
28. Maselli RA, Mass DP, Distad BJ, Richman DP (1991) Anconeus muscle: a human muscle preparation suitable for in-vitro microelectrode studies. *Muscle Nerve* 14: 1189-1192
29. Maselli RA, Wollman RL, Leung C, Distad B, Palombi S, Richman DP, Salazar-Gruoso EF, Roos RP (1993) Neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 16: 1193-1203
30. Mateen FJ, Carone M, Sorenson EJ (2010) Patients who survive 5 years or more with ALS in Olmsted County, 1925-2004. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81: 1144-1146
31. Meriggioli MN, Howard JFJ, Harper CMJ (2003) Pathophysiology of neuromuscular junction disorders. In: *Neuromuscular Junction Disorders: Diagnosis and Treatment* . CRC Press. pp. 37-57
32. Naumenko N, Pollari E, Kurronen A, Giniatullina R, Shakirzyanova A, Magga J, Koistinaho J, Giniatullin R (2011) Gender-Specific Mechanism of Synaptic Impairment and Its Prevention by GCSF in a Mouse Model of ALS. *Front Cell Neurosci*. Doi:10.3389/fncel.2011.00026
33. O'Malley JP, Waran MT, Balice-Gordon RJ (1999) In vivo observations of terminal Schwann cells at normal, denervated, and reinnervated mouse neuromuscular junctions. *J Neurobiol* 38: 270-286
34. O'Neill JH, Murray NM, Newsom-Davis J (1988) The Lambert-Eaton myasthenic syndrome. A review of 50 cases. *Brain* 111 (Pt 3): 577-596
35. Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P (2006) Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 9: 408-419
36. Rocha MC, Pousinha PA, Correia AM, Sebastiao AM, Ribeiro JA (2013) Early Changes of Neuromuscular Transmission in the SOD1(G93A) Mice Model of ALS Start Long before Motor Symptoms Onset. *PLoS One*. Doi: 10.1371/journal.pone.0073846
37. Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joo F, Appel SH (1996) Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39: 203-216
38. Son YJ, Thompson WJ (1995) Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14: 133-141

39. Stalberg E (1982) Electrophysiological studies of reinnervation in ALS. *Adv Neurol* 36: 47-59
40. Tsujihata M, Hazama R, Yoshimura T, Satoh A, Mori M, Nagataki S (1984) The motor end-plate fine structure and ultrastructural localization of acetylcholine receptors in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 7: 243-249
41. Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Del Gaizo Moore V, Yoshikawa M, Hampton TG, Pevette D, Caress J, Oppenheim RW, Milligan C (2013) Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav* 3: 431-457
42. Wang FC, De Pasqua V, Gerard P, Delwaide PJ (2001) Prognostic value of decremental responses to repetitive nerve stimulation in ALS patients. *Neurology* 57: 897-899
43. Wohlfart G (1957) Collateral regeneration from residual motor nerve fibers in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 7: 124-134
44. Yamashita S, Sakaguchi H, Mori A, Kimura E, Maeda Y, Hirano T, Uchino M (2012) Significant CMAP decrement by repetitive nerve stimulation is more frequent in median than ulnar nerves of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 45: 426-428
45. Yoshihara T, Ishii T, Iwata M, Nomoto M (1998) Ultrastructural and histochemical study of the motor end plates of the intrinsic laryngeal muscles in amyotrophic lateral sclerosis. *Ultrastruct Pathol* 22: 121-126

Figure legends

Fig. 1 NMJs observed by confocal microscopy: morphology of the postsynaptic apparatus

α -Bungarotoxin staining of AChRs, in red **a** Normal, "pretzel-shaped", postsynaptic apparatus. **b** Normal postsynaptic apparatus made of separated cups in close contact with each other, resembling a "cat paw track". **c-e** Denervation-induced modifications of the postsynaptic apparatus. Fragmentation and enlargement of the postsynaptic apparatus with flattening of the primary synaptic gutter. **f** Barely visible postsynaptic apparatus, usually seen in the absence of contact with a nerve terminal profile, i.e. completely denervated NMJ. Scale bars, 5 μ m.

Fig. 2 "Spiculated" NMJs observed by confocal microscopy

α -Bungarotoxin staining of AChRs, in red. The outer edge of the postsynaptic primary gutter shows spike-like areas (arrows). **a, b** Fragmented spiculated gutters with moderate (a) or extensive (b) fragmentation. **c, d** Isolated spiculated cups. Scale bars, 5 μ m.

Fig. 3 Images extracted from three-dimensional surface reconstructions of postsynaptic compartments observed by confocal microscopy after α -bungarotoxin staining of AChRs

a, b "Cat paw track" postsynaptic apparatus with moderate fragmentation, without spiculation, top view (a) and oblique view (b). **c, d** Spiculated primary synaptic gutter. "Spicules" arising laterally from the edge of the synaptic gutter (arrows), top view (c) and oblique view (d). **e, f** Three-dimensional surface reconstruction of the postsynaptic apparatus presented in Figure 2c. Isolated cups with a marked spiculated appearance (arrows), top view (e) and oblique view (f). Scale bars, 5 μ m.

Fig. 4 NMJs from ALS patients observed by electron microscopy

a A flattened primary synaptic gutter with well-preserved subneural folds (arrows) faces a remodelled motor nerve terminal. The vacuoles within the nerve ending (N) are probably artifactual. The terminal Schwann cell caps the nerve terminal (star: terminal Schwann cell nucleus). Multiple layers of terminal Schwann cell basal lamina can be seen near the primary synaptic cleft (arrowheads). **b** On the crests of the subneural folds, where AChRs are present, the muscle postsynaptic membrane shows an electron-opaque border (arrow). In some cases, this dark border seemed to extend to the immediately adjacent unfolded postsynaptic membrane (arrowheads). **c, d** Denervated NMJs. **c** Partially denervated NMJ. A small nerve terminal profile (N) partially occupies the primary synaptic gutter. Note the well-preserved secondary synaptic clefts (arrow) and the terminal Schwann cell capping the nerve terminal (arrowhead). **d** Completely denervated NMJ. Unoccupied synaptic gutter with well-preserved subneural folds (arrow) and absence of nerve terminal. Residual terminal Schwann cell basal lamina can be seen in the remaining primary synaptic cleft (arrowhead). Scale bars, 2 μ m.

Fig.5 NMJs observed by confocal microscopy

Staining of AChRs with α -bungarotoxin, in red, and of axon terminals with neurofilament antibody, in green. **a** Normal control NMJ (profile view). The motor axon divides into two first-order branches. **b** Completely denervated NMJ with no axon profile. Note the low AChR staining of the postsynaptic compartment. **c** Reinnervated NMJ. A fragmented postsynaptic apparatus is innervated by a motor axon which divides into two first-order branches (arrowheads). Note the fine nodal sprout reinnervating two postsynaptic elements (arrow). **d** Remodelled, partially innervated NMJ. The axon terminal partially innervates a slightly flattened postsynaptic apparatus. Scale bars, 5 μ m.

Fig. 6 NMJs observed by confocal microscopy after staining of AChRs with α -bungarotoxin, in red, and of terminal Schwann cells with anti-S100 antibody, in green

a A terminal Schwann cell (arrow) caps a postsynaptic apparatus made of two close synaptic cups. There is no growth of Schwann cell cytoplasmic processes. **b** A terminal Schwann cell (arrow) elaborates two cytoplasmic processes (arrowheads), each process contacting one postsynaptic element. Scale bars, 5 μ m.

Fig.7 Electron microscopy view: marked interposition of the terminal Schwann cell between the axon terminal and the postsynaptic muscle membrane

a, b. The membrane of the terminal Schwann cell (star) enters the synaptic cleft (arrowhead) and encases the nerve ending (N). Secondary synaptic clefts are maintained (white arrow). Note in (b) that the area of the muscle postsynaptic membrane facing the residual part of the nerve terminal, available for neurotransmission, is very narrow. Scale bars, 2 μ m.

Fig. 1

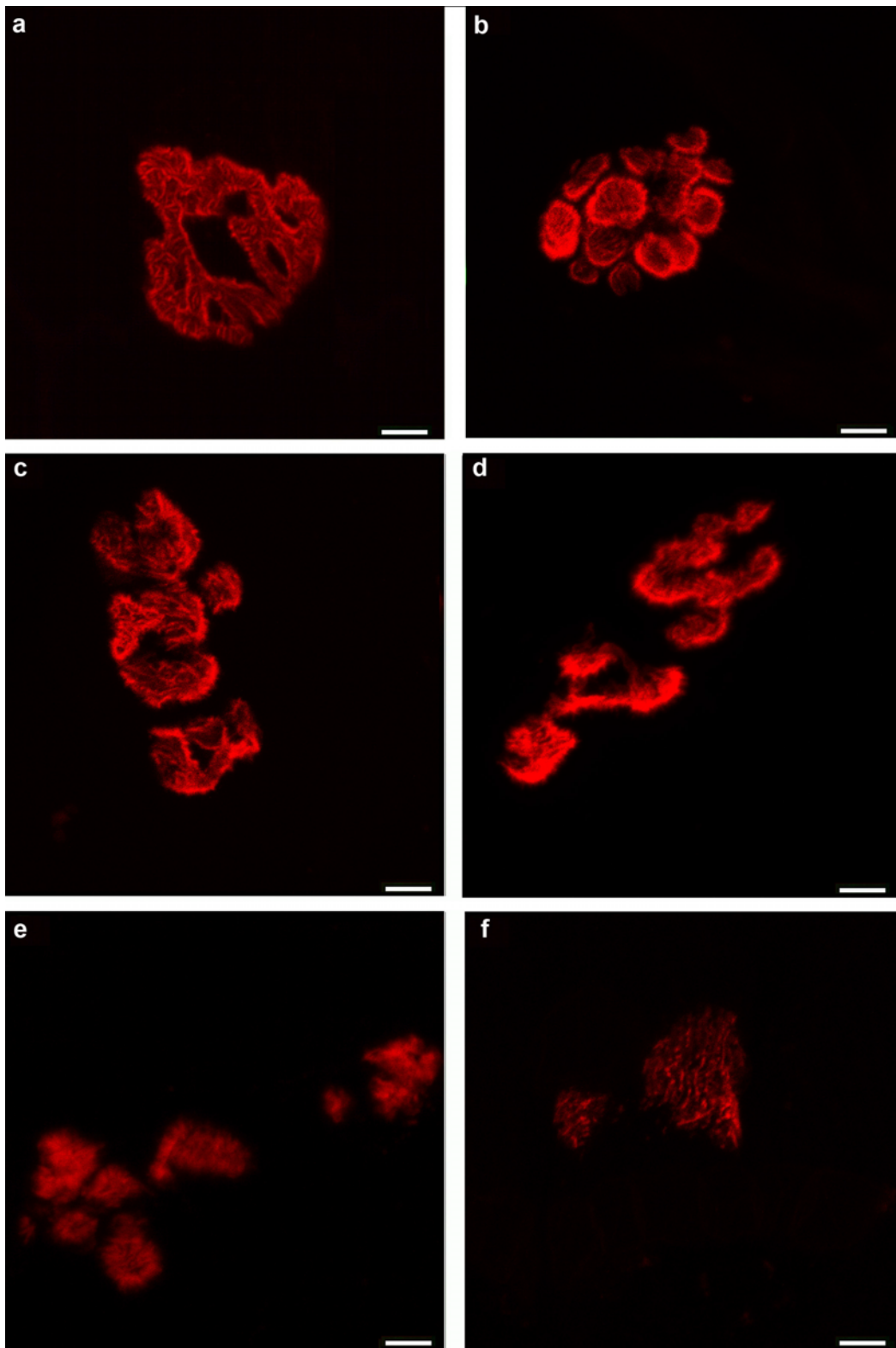


Fig. 2

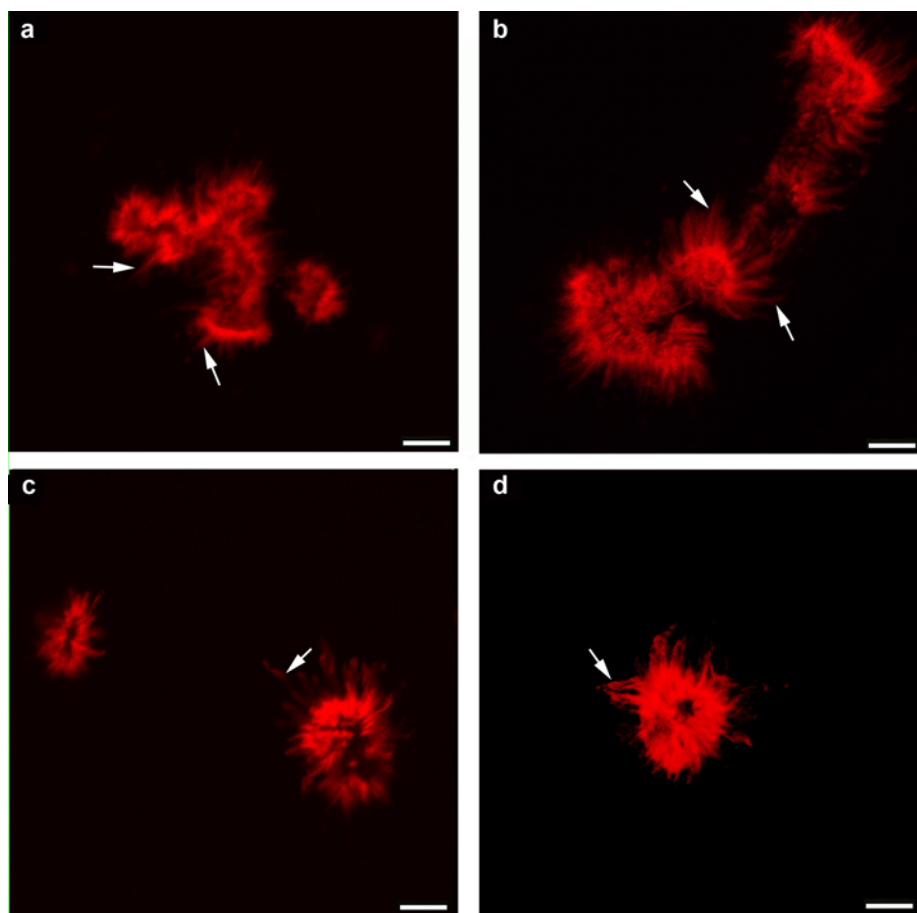


Fig. 3

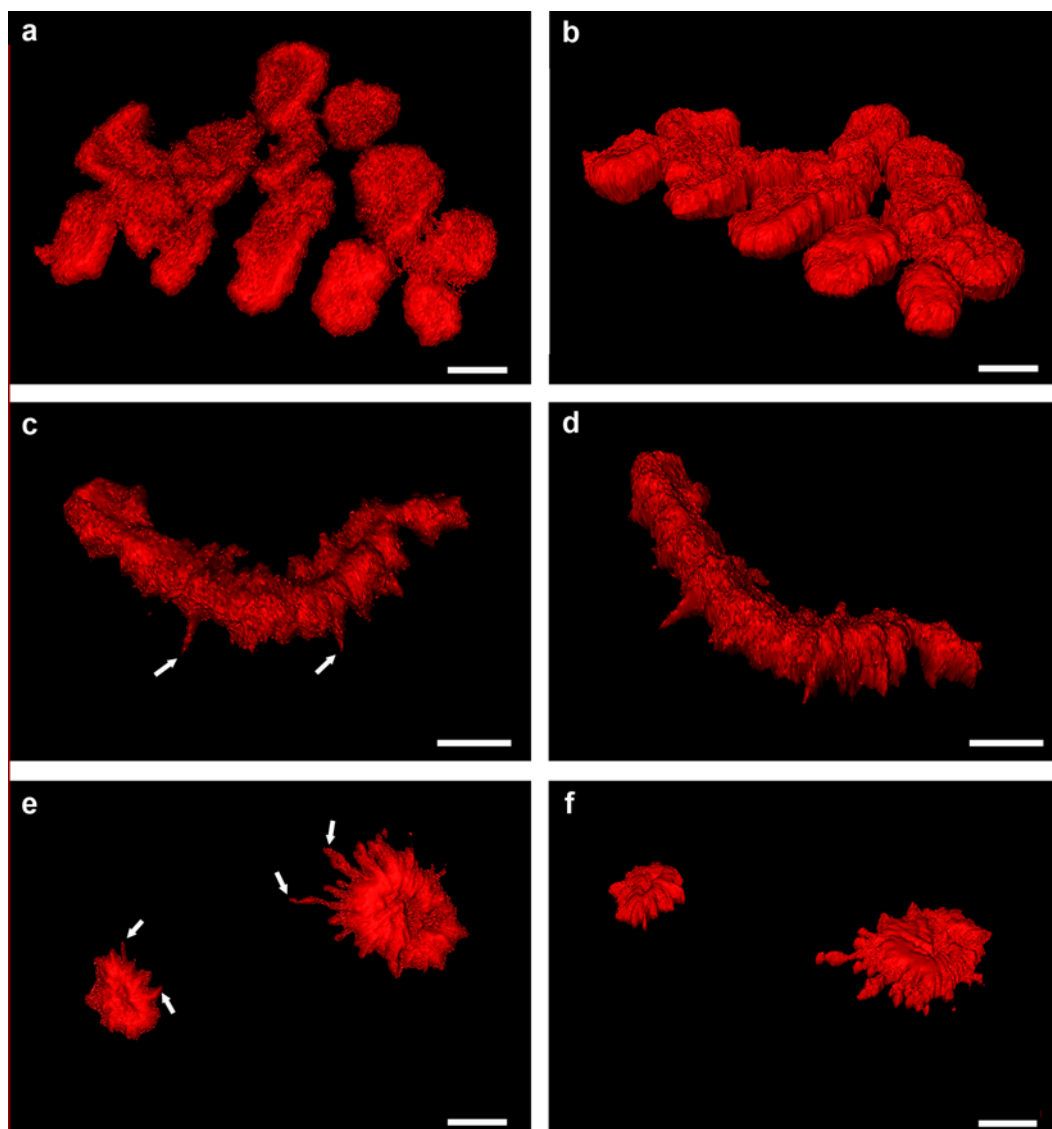


Fig. 4

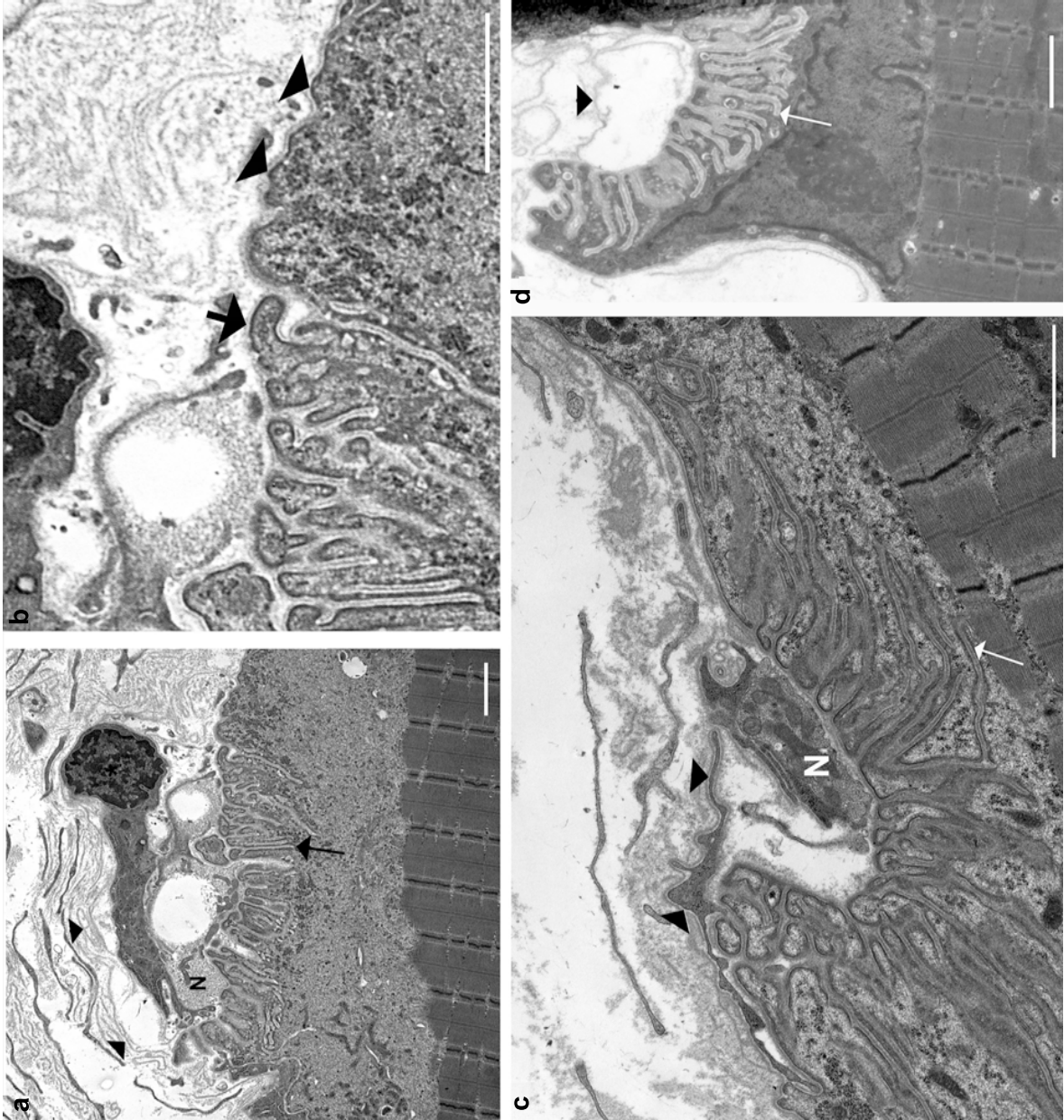


Fig. 5

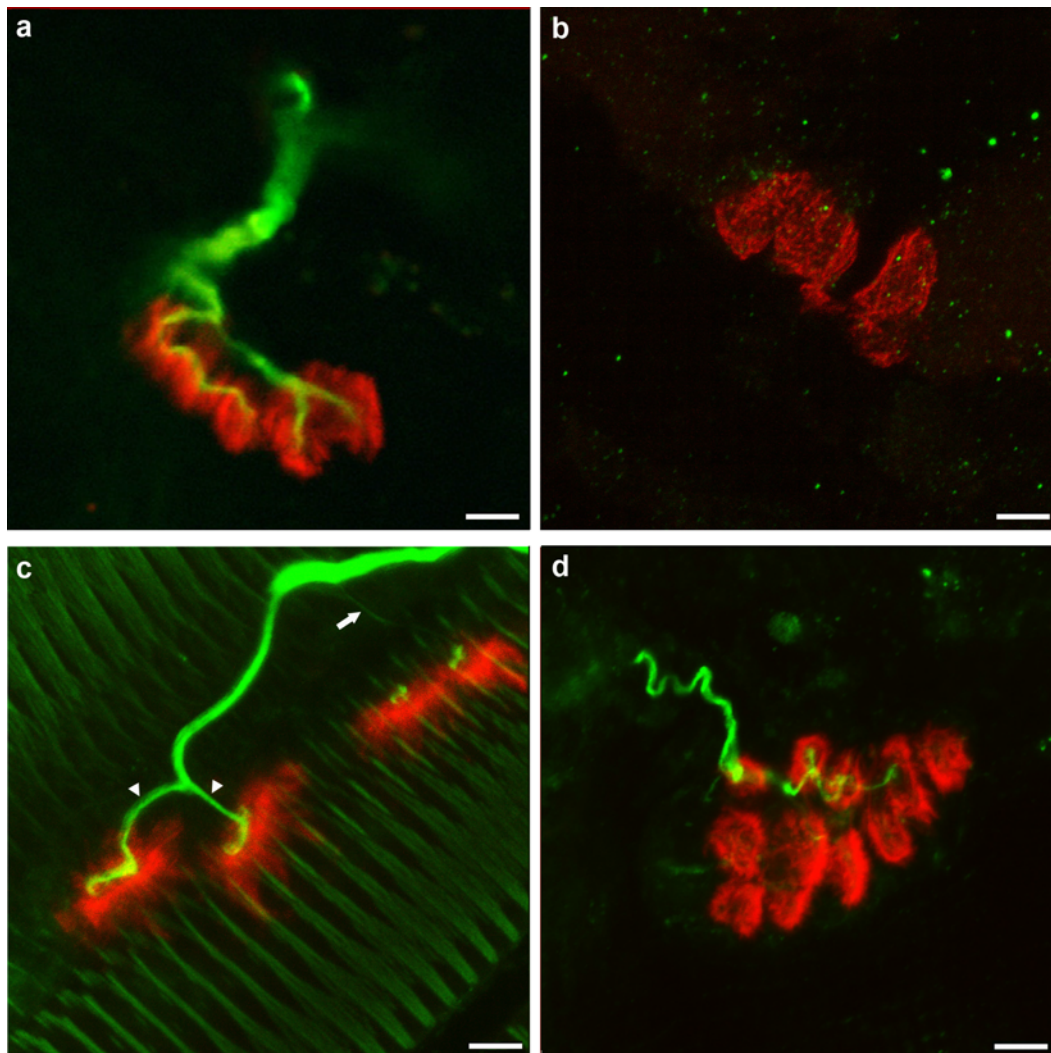


Fig. 6

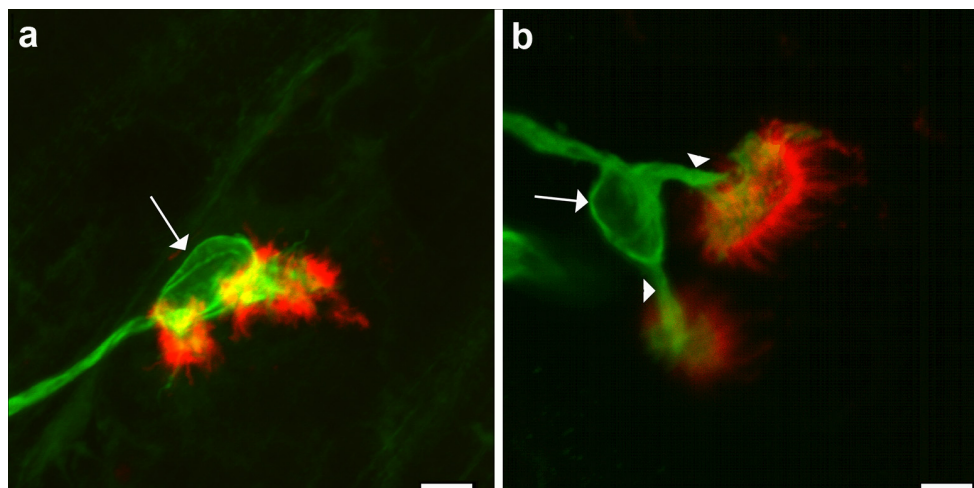


Fig. 7

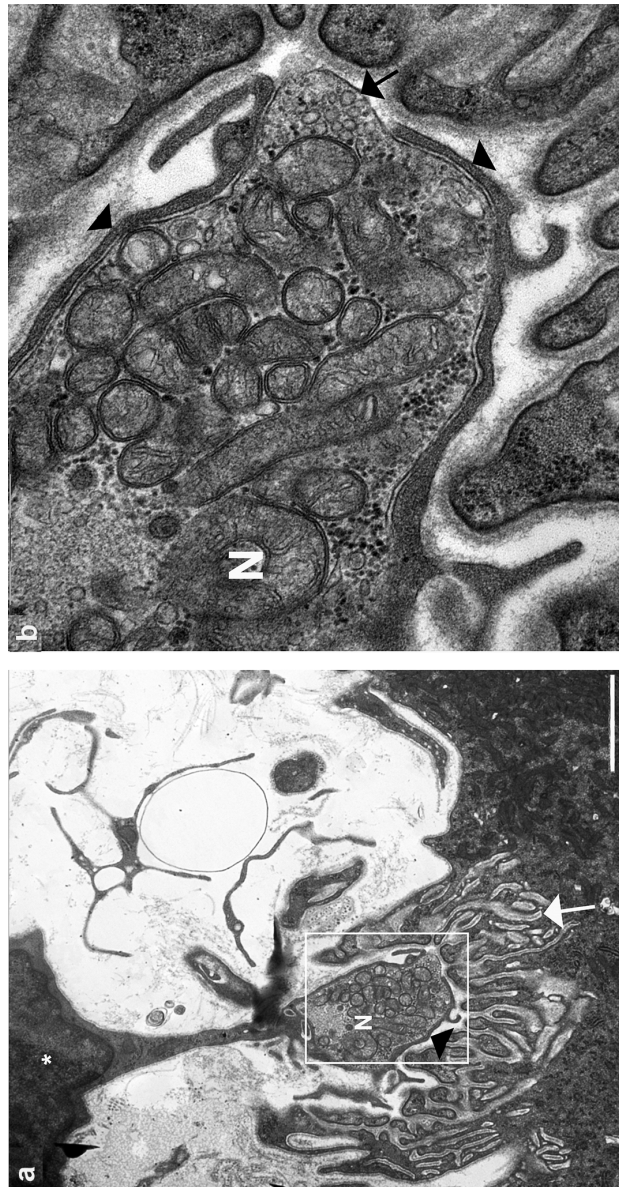


Table 1 Demographic and clinical characteristics of ALS patients

Patient no./sex	Site of disease onset	Age (y)	Disease duration at the time of muscle biopsy (m)	ALS-FRS score at the time of muscle biopsy (m)	Follow-up duration (m)	Disease progression rate ^a (units/m)
1/F	BULBAR	60	9	42	16	2.1
2/M	BULBAR	56	14	39	13	1.3
3/F	SPINAL	63	10	35	39	0.6
4/M	SPINAL	50	12	37	1	9.1
5/F	SPINAL	48	9	30	34	4.4
6/M	SPINAL	53	193	32	27	0.0
7/F	SPINAL	36	85	32	28	0.1
8/M	SPINAL	52	101	37	28	-0.1
9/F ^b	SPINAL	55	100	41	26	0.2
ALS patients ^c		53	14	36	24	2.0

Patients 6 to 9 met the criteria for long-term ALS survivors [30]

^aDisease progression rate = (ALSFRS-R score at "time of biopsy" - ALSFRS-R score at "last follow-up")/follow-up duration after biopsy

Mean disease progression rate was significantly different between the rapidly progressive ALS group and the long-term ALS survivors group (respectively 3.5 and 0.1 units/month, $P = 0.016$). The slightly negative disease progression rate in one long-term ALS survivor (patient no. 8) reflects daily fluctuations in function that can be encountered in case of tiredness or spasticity. ^bMutation on the SOD1 gene (c.418A>G, amino acid numbering according to the ALS online database: N139D). ^cValues are means, except for disease duration (median disease duration at the time of the biopsy).

Table 2 Morphological characteristics of NMJs of ALS patients

Patient no.	1 (n=61)	2 (n=41)	3 (n=34)	4 (n=68)	5 (n=41)	Early ALS patients	6 (n=58)	7 (n=70)	8 (n=22)	9 (n=35)	Long- term survivors
Spiculated NMJs (%)	31.1	4.9	32.4	29.4	29.3	26.1	20.7	72.9	59.1	11.4	43.2
Mean number of axons per NMJ	1	1.07	1	1	1	1.01	1.09	1.04	1.13	1	1.06
Mean number of first-order branches per axon	1.09	0.93	0.63	1	1.63	1.05	1.79	0.91	0.89	0.36	1.14
Mean number of sprouts per axon	1.36	1.4	0.25	0.5	1.25	1.11	1.38	0.42	1.56	0.73	0.96
Mean number of postsynaptic elements per TSC	1.57	1	2.22	1.86	1.63	2.18	2.58	2	3	1	1.75
Mean number of processes per TSC	2.67	ND	2	1.96	3	2.24	2.38	2.17	2	2	2.21

Patients 1 to 5: early ALS patients, patients 6 to 9: long-term ALS survivors. n= number of NMJs analyzed for each patient.

ND: not determined. Values are presented as means for both ALS groups. Differences between groups were not statistically significant.

Online Resource 1

Title: A comprehensive study of neuromuscular junction morphology in patients with amyotrophic lateral sclerosis: major structural alterations are present from the early stage of the disease

Journal name: Acta Neuropathologica

Authors: Gaëlle Bruneteau, Stéphanie Bauché, Guy Brochier, Nathalie Mandjee, Marie-Laure Tanguy, Anthony Behin, Frédéric Khiami, Elhadi Sariali, Caroline Hell-Remy, François Salachas, Pierre-François Pradat, Lucette Lacomblez, Bertrand Fontaine, Michel Fardeau, Vincent Meininger, Emmanuel Fournier, Jeanine Koenig and Daniel Hantäi.

Corresponding author:

Dr Gaëlle BRUNETEAU, Département de Neurologie, centre référent SLA

Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47-83 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France

Phone: +33 142 162471

Fax: +33 142 162473

E-mail: gaelle.bruneteau@psl.aphp.fr

Table 1: Surface-recording study of neuromuscular transmission

Patient	Right ulnar nerve		Left ulnar nerve		Right radial nerve		Left radial nerve		Right spinal nerve		Left spinal nerve		Right peroneal nerve		Left peroneal nerve		Right V-XII cranial nerves		Left V-XII cranial nerves	
	CMAP (mV)	RNS ^a (%)	CMAP (mV)	RNS ^a (%)	CMAP (mV)	RNS ^a (%)	CMAP (mV)	RNS ^a (%)	CMAP (mV)	RNS ^a (%)	CMAP (mV)	RNS ^a (%)	CMAP (mV)	RNS ^a (%)	CMAP (mV)	RNS ^a (%)	CMAP (mV)	RNS ^a (%)	CMAP (mV)	RNS ^a (%)
1	14.1	1	9.9	-1	9.4	0	6	5	7.8	1	7.3	-1	7.9	-1	7.9	6	4.3	-6	2.5	-7
2	6.9	2	12.3	2	12.1	-1	9.4	2	12.4	0	9.3	2	5.8	-2	6	-1	2	3	1.9	2
3	8.7	0	7.7	0	3	0	3.6	0	6	-6	4.7	0	1.9	0	2.7	-1	1.7	1	1.5	1
4	9.8	2	12.2	-4	3.9	-16	1.2	-16	9.1	-8	8.5	-3	0	NA	0	NA	7.2	1	5.9	-2
5	6.3	-3	ND		5.5	-2	2.3	-9	10.9	-2	10.9	-3	6.5	1	6.5	2	2.8	7	5	1
6	11.7	1	1.9	-2	11.7	6	11.5	5	12.1	-3	14.1	-6	7.3	1	8.2	-2	3	1	3.3	-3
7	4.4	1	6.2	4	0.9	-2	1.9	-26	9.1	-3	9.4	5	7.7	-6	8.2	-7	1.4	0	1.5	3
8	8.8	-4	3.5	-3	0	NA	0.7	-3	8.4	-1	9.5	-3	4.6	1	3.9	-1	2.4	2	5.2	10
9	8.4	-2	11.7	0	5.1	-25	3.2	-4	12	-1	10.8	-1	0.6	-21	2.4	-17	4.4	1	5.1	2

The RNS test at slow stimulus rate (10 stimuli at 3 Hz) was performed at room temperature, bilaterally on the spinal nerve (recording electrode over the upper trapezius muscle), the ulnar nerve (recording electrode over the hypothenar muscle), the radial nerve (recording electrode over the anconeus muscle), the deep peroneal nerve (recording electrode over the tibialis anterior muscle), and the cranial nerves V and XII (recording electrode over the submandibular region). ^a For each train of repetitive stimuli, the difference between the amplitude of the first and fifth CMAPs was expressed as a percentage.

CMAP: compound motor action potential at rest. RNS: repetitive nerve stimulation. ND: not done. NA: not applicable.

XII. DISCUSSION GENERALE

Nous avons inclus dans notre étude 11 patients atteints de SLA: 6 patients au stade précoce de la maladie et ayant présenté une évolution rapide de la maladie; et 5 patients avec une évolution lente de la maladie (survie supérieure à 5 ans associée à une atteinte fonctionnelle motrice modérée). Les caractéristiques de ce groupe de patients "survivants à long-terme" (groupe 2, SLA d'évolution lente) étaient identiques à celles rapportées dans la littérature avec un âge de début des symptômes moteurs significativement plus jeune (Zoccolella et al., 2008; Turner et al., 2003) et une tendance à une moins grande fréquence des formes à début bulbaire (Mateen et al., 2010). Une évaluation électrophysiologique de la TNM a été réalisée, en ENMG de surface, avant la réalisation de la biopsie musculaire et 3 mois plus tard. Tous les patients ont été suivis cliniquement de façon prospective après la réalisation de la biopsie musculaire. Les caractéristiques morphologiques observées au niveau des JNM ont été corrélées aux résultats de l'étude électrophysiologique de la TNM et aux données cliniques.

Caractérisation morphologique des JNM dans la SLA

Il s'agit de la première étude morphologique des JNM dans la SLA chez l'homme, utilisant de façon combinée la microscopie confocale et la microscopie électronique. L'utilisation de la microscopie confocale nous a permis d'analyser l'organisation topographique de plus de 400 JNM. Les données obtenues en microscopie confocale ont ensuite été complétées par les résultats de l'analyse ultrastructurale en microscopie électronique, nécessairement réalisée sur un plus petit nombre de JNM par patient.

Expression des cholinestérases

Au niveau de la JNM des vertébrés, 2 enzymes possédant des caractéristiques catalytiques différentes peuvent hydrolyser les molécules d'ACh: l'AChE et la BChE (Girard et al., 2006). La fonction classique de l'AChE dans la régulation de la durée d'action de l'ACh au niveau de la fente synaptique est bien établie. Au cours de leur diffusion dans la fente synaptique ou après leur séparation des RACH, la plupart des molécules d'ACh sont rapidement hydrolysées par l'AChE (Aldunate et al., 2004). La BChE catalyse également l'hydrolyse de l'ACh, même si de façon moins efficace que l'AChE. La BChE est donc également susceptible de participer à la dégradation de l'ACh mais son rôle physiologique est moins bien connu. Chez l'homme, de nombreux variants alléliques réduisent ou suppriment l'activité de la BChE, sans traduction

pathologique en dehors d'une sensibilité accrue à la succinylcholine (curare utilisé en anesthésie) dont l'hydrolyse n'est plus assurée, conduisant à un blocage prolongé de la transmission neuromusculaire (Levano et al., 2005). Chez le rongeur, la BChE est normalement exprimée au niveau de la JNM au cours du développement, mais son activité diminue rapidement en postnatal (Berman et al., 1987). La BChE reste cependant exprimée au niveau des plaques motrices matures (Girard et al., 2007) et semble localisée au niveau des plis sous-neuraux (Blondet et al., 2010). Cette localisation ne semble pas modifiée après régénération d'une lésion nerveuse expérimentale (Blondet et al., 2010). La dénervation musculaire s'accompagne d'une diminution marquée de la présence de l'AChE mais ne semble pas modifier l'expression des différentes formes moléculaires de BChE (Berman et al., 1987). Dans notre étude, la présence d'AChE et de BChE était détectable chez tous les patients étudiés, colocalisant partiellement avec la zone révélée par le marquage des RCh. La méthodologie utilisée ici (absence de muscle contrôle lors de la révélation des cholinestérases par la méthode de Koelle) ne nous a pas permis d'évaluer leur activité enzymatique respective, mais une baisse de l'activité de l'AChE au niveau des JNM a été rapportée précédemment dans la SLA (Fernandez et al., 1986; Yoshihara et al., 1998).

Modifications morphologiques en rapport avec la dénervation

En microscopie électronique, nous avons observé des aspects de réduction de l'innervation déjà décrits dans la SLA (Tsujihata et al., 1984; Yoshihara et al., 1998) : plaques motrices "dénudées" de leurs terminaisons nerveuses parfois recouvertes par la cellule de Schwann terminale, présence de terminaisons nerveuses de très petite taille, aplatissement de la gouttière synaptique mais avec des plis sous-neuraux souvent relativement bien préservés. En microscopie confocale, nous avons mis en évidence un élargissement et une fragmentation du versant postsynaptique déjà rapportés dans la SLA avec d'autres techniques (Bjornskov et al., 1975). Ces modifications sont classiquement observées au cours des pathologies s'accompagnant de phénomènes de dénervation/réinnervation. L'augmentation de la surface occupée par les plaques motrices, visualisées par la méthode de révélation des cholinestérases de Koelle modifiée, a ainsi été rapportée par Coërs et Woolf au cours de différents cas de pathologies chroniques du motoneurone (Coërs et Woolf, 1959). Ces auteurs ont également décrit une variabilité accrue du nombre d'éléments constituant le compartiment postsynaptique au cours du phénomène de dénervation/réinnervation, certains étant constitués d'un seul élément et d'autres de très nombreuses unités, et apparaissant alors très fragmentés. Chez nos patients, plus de 75% des JNM examinées présentaient un versant postsynaptique

fragmenté, constitué de 2 à 4 éléments. Trois patients présentaient une répartition de la fragmentation des JNM notablement différente du reste du groupe. Le patient 1 (porteur d'une expansion de taille intermédiaire sur le gène ATXN2, considérée comme un facteur de risque de SLA sporadique) et le patient 8 présentaient une plus grande proportion d'appareils sous-neuraux constitués d'un seul élément (environ un tiers des JNM examinées). A l'inverse, le patient 11, porteur d'une mutation pathogène sur le gène SOD1, présentait une plus grande proportion de JNM très fragmentées (≥ 5 éléments, près de 40% des JNM observées). L'origine de cette différence de fragmentation n'est pas clairement définie.

Aspect de spiculation de la gouttière primaire:

En microscopie confocale après marquage des RACH, nous avons observé que le pourtour de la gouttière primaire de certaines JNM semblait présenter des pointes dirigées vers l'extérieur, aspect que nous avons décrit sous le terme de "spicules". La proportion de JNM "spiculées" était plus élevée dans le groupe des "survivants à long-terme" (43.2% contre 26.1% dans le groupe 1), mais cette différence n'atteignait pas le seuil de significativité.

Cet aspect de "spiculation" de la gouttière primaire est inhabituel et n'a jamais, à notre connaissance, été rapporté en microscopie confocale. La reconstruction en 3D des JNM concernées, à partir des piles de coupes obtenues en microscopie confocale, montre que ces spicules semblent s'étendre latéralement à partir du bord de la gouttière synaptique - ou des éléments postsynaptiques résiduels - qui peut (peuvent) être plus ou moins aplatie(s). En microscopie électronique nous avons observé un liseré dense aux électrons - identique à celui observé au niveau des crêtes des plis sous-neuraux où sont normalement concentrés les RACH (Porter et Barnard, 1975; Bader, 1981) - de la zone de la membrane musculaire postsynaptique immédiatement adjacente à la gouttière résiduelle mais ne présentant plus de plissement sous-neural. Cet aspect de spicules tel que nous l'avons observé en microscopie confocale pourrait donc correspondre à la présence de RACH au niveau de la membrane musculaire postsynaptique immédiatement adjacente à la gouttière synaptique résiduelle. La persistance des RACH, au niveau jonctionnel, a déjà été démontrée après plusieurs semaines de dénervation (Frank et al., 1976; Kumai et al., 2005), mais la localisation des RACH décrite dans ces études est identique à celle observée au sein de muscles normalement innervés (c'est à dire au sommet des plis sous-neuraux) (Bader, 1981). De surcroît, l'analyse des JNMs dans certains syndromes myasthéniques congénitaux s'accompagnant d'une dénervation fonctionnelle n'a pas mis en évidence de spiculation du pourtour de la gouttière primaire (Ishigaki et al., 2003; Chevessier et al., 2004; Huze et al., 2009). Il semble donc peu probable

que cet aspect de "spiculation" de la gouttière primaire soit en rapport avec le seul phénomène de dénervation, mais il pourrait être associé à des épisodes itératifs de dénervation/réinnervation rencontrés dans la SLA. Dans notre étude, la proportion de JNM spiculées corrélait positivement avec le nombre d'éléments postsynaptiques en contact, par l'intermédiaire d'un prolongement cytoplasmique, avec une même cellule de Schwann. Or, après dénervation expérimentale, on observe la croissance de nombreux prolongements cytoplasmiques à partir de la cellule de Schwann terminale de la JNM dénervée. Ces prolongements Schwanniens vont venir former des "ponts" entre JNM voisines, qui vont guider la réinnervation (Son et Thompson, 1995; Kang et al., 2003). Ces ponts Schwanniens croissent du site dénervé vers le site innervé et, si les mécanismes de guidage ne sont pas encore déterminés, les signaux dirigeant la croissance Schwannienne semblent être une conséquence de l'activité postsynaptique au niveau du site innervé (Kang et al., 2003). Après dénervation expérimentale, les axones moteurs utilisent les tubes endoneuraux résiduels pour aller réinnervier les JNM dénervées. L'axone moteur peut ensuite poursuivre sa croissance au delà de la JNM nouvellement réinnervée, et utiliser le réseau de ponts Schwanniens pour aller réinnervier une JNM voisine (Son et al., 1996; O'Malley et al., 1999). La réinnervation d'une JNM peut aussi s'effectuer à partir de la JNM d'une fibre voisine encore innervée en empruntant un pont Schwannien (Son et Thompson, 1995; O'Malley et al., 1999). Après réinnervation, les ponts cytoplasmiques Schwanniens qui n'ont pas été empruntés par un bourgeon axonal régressent et seuls persistent ceux qui ont guidé la réinnervation (Son et Thompson, 1995; O'Malley et al., 1999). Dans notre étude, on peut donc logiquement considérer qu'une même cellule de Schwann terminale contactera, via un prolongement Schwannien, un nombre d'éléments postsynaptiques d'autant plus élevé que la JNM aura été le siège de phénomènes de dénervation/réinnervation plus nombreux. La visibilité, en microscopie électronique, d'empilements de lames basales Schwanniennes - attribués aux phénomènes d'avancée/rétractation des expansions au cours du processus de régénération (Couteaux et al., 1988) - est compatible avec un mécanisme de ce type. A partir des données obtenues après dénervation expérimentale, on s'attendrait cependant à ce que ces éléments postsynaptiques soient issus de JNM voisines. Nos résultats en microscopie confocale ne sont pas en faveur de cette hypothèse, les éléments postsynaptiques en rapport avec une même cellule de Schwann n'étant généralement pas assez éloignés pour être issus de JNM distinctes. Nos résultats pourraient impliquer un mécanisme de dénervation plus distal que celui objectivé après section ou écrasement du tronc nerveux (dénervation expérimentale), la

formation de ponts Schwanniens et le processus de réinnervation se faisant alors également au sein même de la JNM.

Un seul travail a rapporté, à ce jour, les résultats de l'analyse en microscopie confocale des JNM chez des patients atteints de SLA. Liu et collaborateurs ont étudié par des immunomarquages sur coupes au cryostat les JNM de 10 muscles des membres et 27 muscles extraoculaires issus de 7 patients décédés d'une SLA. Les JNM étaient repérées par marquage des RACH par l' α -BGT. La présence de différentes protéines était recherchée au niveau de chaque JNM : neurofilament 70kD (marqueur de l'axone), synaptophysine (marqueur des vésicules synaptiques de la terminaison axonale), et 3 marqueurs de la cellule de Schwann terminale : protéines S100, p75^{NTR} et GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Au stade terminal de la maladie, les JNM des muscles des membres apparaissaient nettement plus touchées par le processus de dénervation (absence ou diminution du co-marquage par le neurofilament 70kD et la synaptophysine) que les muscles extraoculaires (Liu et al., 2013). Ce résultat est en accord avec les données cliniques, puisque les muscles oculomoteurs sont classiquement longtemps épargnés par l'atteinte motrice clinique (Swash, 2000). La "résistance" des muscles oculomoteurs au processus pathologique pourrait être en rapport avec les caractéristiques particulières de ces muscles dont certaines fibres "lentes", dédiées aux mouvements toniques, sont multi-innervées (Rita, 1967). La technique utilisée dans ce travail (immunomarquages sur coupes et non sur échantillon musculaire de grande taille et épaisseur) ne permettait pas d'analyser précisément l'architecture de la JNM et en particulier de visualiser une éventuelle spiculation du versant postsynaptique. Les auteurs mettaient par contre en évidence une diminution marquée de l'immunoréactivité S100 au niveau des JNM des muscles des membres et des muscles oculomoteurs, diminution qui n'est pas retrouvée dans notre étude et qui sera discutée dans le paragraphe consacré aux anomalies de la cellule de Schwann terminale.

Le processus de réinnervation collatérale dans la SLA

L'existence d'un processus de réinnervation collatérale dans la SLA est attestée par les résultats d'études en coloration argentique ou au bleu de méthylène des terminaisons axonales (Coërs, 1955; Wohlfart, 1957; Bjornskov et al., 1984). Son évolution au cours du temps a été étudiée par des techniques électrophysiologiques de mesure du nombre et de la taille des UM (Hansen et Ballantyne, 1978; Stalberg, 1982; Dengler et al., 1989; Dantes et McComas, 1991; McComas et al., 1993). La perte en UM est précoce et rapide dans la SLA, avec une

diminution de 50% du nombre d'UM restantes tous les 6 mois en moyenne pendant la première année, à partir du moment où un muscle donné est touché par le processus pathologique (Dantes et McComas, 1991; McComas et al., 1993). Le processus de réinnervation collatérale se traduit par une augmentation progressive de l'aire des PUM au cours de la maladie, qui peut atteindre jusqu'à 4 fois la valeur des sujets contrôles (Hansen et Ballantyne, 1978). Cette augmentation de taille des UM survivantes permet de compenser complètement, sur un plan électrophysiologique, jusqu'à 50% de perte en UM fonctionnelles (maintien d'amplitudes motrices normales lors de l'enregistrement après stimulation unique supramaximale du nerf) (Hansen et Ballantyne, 1978). Si la surface d'une UM peut atteindre jusqu'à 4 fois sa valeur normale, 25% d'unités motrices restantes seraient théoriquement suffisantes pour compenser totalement la baisse du nombre d'UM fonctionnelles. La réinnervation collatérale semble cependant moins efficace au fur et à mesure que la perte en UM se majore au-delà de 50% (Hansen et Ballantyne, 1978; McComas et al., 1993). L'origine de cette baisse d'efficacité du processus de réinnervation collatérale n'est pas clairement définie et ne correspond pas nécessairement à une accélération de la perte en motoneurones fonctionnels susceptibles de produire une réinnervation compensatrice. Au sein d'un muscle donné, le nombre d'UM semble d'ailleurs diminuer de façon plus lente au delà de 1 an après le début du processus (Dantes et McComas, 1991; McComas et al., 1993). Cette réduction de l'efficacité du processus de réinnervation pourrait également être en partie liée à des contraintes "géographiques", la réinnervation collatérale étant plus efficace dans les zones de chevauchement des UM ("capture" des fibres musculaires d'autres UM présentes au sein des limites territoriales initiales de l'UM). Au fur et à mesure que le nombre de motoneurones fonctionnels diminue, le degré de chevauchement territorial des UM se réduit et la réinnervation ne peut s'effectuer que par bourgeonnement à partir d'unités motrices situées plus à distance (Hansen et Ballantyne, 1978; McComas et al., 1993).

Caractéristiques de l'innervation dans la SLA

Notre étude de la JNM en microscopie confocale confirme la présence d'un processus de réinnervation collatérale chez les patients atteints de SLA. En rapport avec le processus de réinnervation collatérale, nous avons observé des JNM polyinnervées (innervation d'une même JNM par plusieurs axones). Le nombre d'axones par JNM corrélait positivement avec la durée d'évolution de la maladie et négativement avec le taux de progression de l'atteinte fonctionnelle motrice au cours du suivi : plus la maladie évoluait lentement et depuis

longtemps, plus le processus de réinnervation collatérale augmentait la probabilité pour une JNM d'être innervée par plusieurs axones.

Les caractéristiques morphologiques de l'innervation étaient identiques dans les 2 groupes de patients (SLA d'évolution rapide et SLA d'évolution lente, "survivants à long-terme") : bourgeonnement collatéral comparable (1.02 bourgeons par axone moteur en moyenne), arborisation terminale souvent peu ramifiée (en moyenne 1,10 branches de division du 1^{er} ordre au niveau de la division terminale de l'axone moteur). L'aspect de l'arborisation terminale normale est variable en fonction de la technique utilisée (Coërs et Woolf, 1959). En microscopie confocale, l'arborisation terminale normale prend le plus souvent l'aspect d'une fourche comportant 2 ou 3 branches. Ce caractère "simple", peu ramifié, de l'arborisation terminale observé dans la SLA peut être en rapport avec l'"immaturité" des JNM réinnervées. La proportion de JNM réinnervées était d'ailleurs inversement corrélée avec le nombre moyen de branches du 1^{er} ordre par axone : la réinnervation était donc associée à une arborisation terminale peu développée. Les aspects morphologiques des bourgeons collatéraux ("sprouts") que nous avons observés étaient également comparables aux données rapportées dans la littérature concernant le phénomène de bourgeonnement collatéral, en général et dans la SLA (Coërs, 1955; Wohlfart, 1957; Coërs et Woolf, 1959). Il s'agit d'axones anormalement fins, terminés par une zone élargie ("boutons" ou "massues de croissance") évoquant un cône de croissance.

Nous n'avons pas observé de JNM d'aspect morphologiquement normal lors de l'analyse en double marquage du versant postsynaptique et de l'axone. Cette observation va dans le sens des résultats rapportés par Coërs sur 32 échantillons musculaires dénervés dont 5 cas de SLA (coloration de l'axone moteur au bleu de méthylène in vivo et de l'appareil sous-neural par la méthode de Koelle modifiée). Celui-ci notait ainsi que même lorsque "la régénération était accomplie", "l'aspect de l'innervation restait très différent de ce qu'il est normalement", associant une variabilité accrue du diamètre des axones terminaux et une dispersion anormalement grande des appareils sous-neuraux (fragmentation et élargissement du versant postsynaptique). Dans la SLA, la taille de la plaque motrice pouvait ainsi atteindre jusqu'à 10 fois le diamètre moyen normal. Le rapport d'innervation terminal (correspondant au nombre de plaques motrices innervées par un même axone) était également très augmenté (jusqu'à 8/1) (Coërs, 1955).

Nous avons également évalué en microscopie confocale, la fraction du versant postsynaptique en contact avec l'innervation pour l'ensemble des JNM innervées. Le "ratio d'occupation du versant postsynaptique" ainsi déterminé était de 0,70 en moyenne pour l'ensemble des

patients. Ce chiffre est plus élevé que celui rapporté par Slater et collaborateurs à partir de l'analyse des JNM de 9 échantillons de muscle quadriceps considérés comme indemnes de toute dénervation musculaire (dont 4 pathologies de type myopathique) (Slater et al., 1992). Dans cette étude, la "fraction d'occupation" était de 40%. Cette discordance s'explique probablement en partie par des différences méthodologiques. Dans le travail de Slater et collaborateurs, la fraction d'occupation était calculée à partir de la mesure en microscopie électronique de la longueur totale de l'appareil sous-neural rapportée à la longueur du périmètre de la terminaison axonale en contact avec la fibre musculaire. Du fait du faible de nombre de JNM analysables en microscopie électronique dans notre étude, nous avons déterminé le "ratio d'occupation du versant postsynaptique" à partir des images obtenues en microscopie confocale, par une estimation visuelle de l'adéquation entre le versant postsynaptique (marqué en rouge) et les ramifications de l'axone terminal (marqué en vert). Le ratio d'occupation du versant postsynaptique corrélait négativement avec le taux de progression de l'atteinte fonctionnelle motrice au cours du suivi : plus le ratio d'occupation du versant postsynaptique était élevé, plus la TNM pouvait potentiellement être efficace et plus la fonction motrice pouvait se maintenir.

Rôle potentiel de HDAC4 musculaire dans la réinnervation et l'atteinte fonctionnelle motrice

Si les caractéristiques morphologiques de l'innervation étaient globalement comparables entre les 2 groupes, le processus de réinnervation collatérale était "quantitativement" plus important chez les patients présentant une évolution très lente de la maladie. Dans le groupe 2 (SLA d'évolution lente ou "survivants à long terme"), 55,6% des JNM observées étaient réinnervées, contre seulement 36,7% dans le groupe 1 (SLA d'évolution rapide). De façon notable, nous n'avons pas observé de JNM morphologiquement normale, y compris chez les patients du groupe 2. La préservation de la fonction motrice n'est donc pas associée, chez ces patients, à une forte proportion de JNM normales (nativement innervées par des motoneurones épargnés par le processus pathologique), mais à la capacité à maintenir une réinnervation compensatrice au cours du temps. L'identification des facteurs qui favorisent le développement et le maintien d'une réinnervation compensatrice chez ces patients pourrait fournir de nouvelles cibles thérapeutiques. Le rôle potentiel de facteurs musculaires dans la réinnervation et la progression de la maladie a été récemment suggéré dans le modèle SOD1 (Williams et al., 2009). Williams et collaborateurs ont ainsi mis en évidence chez la souris SOD1^{G93A} une augmentation marquée, au moment du début des symptômes moteurs, de l'expression musculaire d'un micro-RNA spécifique du muscle : miR-206. Les micro-RNA

sont de petits fragments d'ARN simple brin qui régulent l'expression des gènes chez les eucaryotes. Ils agissent à un niveau post-transcriptionnel en inhibant la traduction de l'ARNm en protéine ou en entraînant sa destruction (van Rooij et Olson, 2007). Chez la souris SOD1^{G93A}, la délétion de miR-206 est responsable d'une accélération significative de la progression de la maladie et d'une baisse de la survie. Chez la souris sauvage, la délétion de miR-206 s'accompagne d'un retard à la réinnervation après dénervation. Dans ce modèle murin, miR-206 ralentirait la progression de la maladie en réprimant la traduction de l'histone déacétylase 4 (HDAC4) et augmentant ainsi l'expression du Fibroblast Growth Factor Binding Protein 1 (FGFBP1). MiR-206 agirait donc en contrecarrant l'effet négatif de HDAC4 sur la réinnervation (Williams et al., 2009). Nous avons étudié l'expression musculaire de miR-206, HDAC4 et FGFBP1 et corrélié les résultats obtenus avec les paramètres cliniques et l'analyse de la réinnervation en microscopie confocale (Bruneteau et al., 2013). Dans notre étude, l'expression musculaire de HDAC4 était significativement plus importante chez les patients présentant une SLA d'évolution rapide et était inversement corrélée à la proportion de JNM réinnervées et au pronostic fonctionnel (progression de l'atteinte fonctionnelle évaluée au cours du temps par l'échelle ALSFRS-R). L'expression musculaire de miR-206 et de FGFBP1 était augmentée dans les 2 groupes de patients mais ne corrélait ni avec le pronostic fonctionnel ni avec l'importance de la réinnervation évaluée en microscopie confocale. Des travaux complémentaires seront donc nécessaires afin d'identifier les mécanismes de régulation par lesquels HDAC4 agit sur la réinnervation chez les patients atteints de SLA.

L'ensemble de nos résultats suggèrent que l'expression musculaire de HDAC4 pourrait jouer un rôle délétère important dans le processus de réinnervation collatérale et l'évolution de l'atteinte fonctionnelle motrice. De façon intéressante, chez la souris SOD1, l'induction de HDAC4 est décelable avant le début des symptômes moteurs, sélectivement dans les muscles contenant une prédominance de fibres de type II, dont les synapses sont les plus vulnérables au processus pathologique (Frey et al., 2000; Cohen et al., 2007). Le rôle potentiellement délétère de HDAC4 est en accord avec ses fonctions connues au niveau du muscle. Au cours du développement, HDAC4 bloque la différenciation myogénique (Braun et Gautel, 2011). En postnatal, dans un muscle normalement innervé, HDAC4 est faiblement exprimé et concentré au niveau des JNM. Après dénervation, HDAC4 s'accumule au sein de noyaux musculaires sur toute la longueur de la fibre musculaire (Cohen et al., 2007). L'accumulation nucléaire de HDAC4 est responsable de l'induction coordonnée des gènes synaptiques après dénervation. L'induction de HDAC4 réprime l'expression de Dach2 et entraîne la dérégulation de la synthèse de myogénine et la réexpression des RACH sur toute la surface de la fibre

musculaire (Cohen et al., 2007). Via la réexpression de la myogénine, HDAC4 a donc une action pro-atrogène, en postnatal, après dénervation (Moresi et al., 2010; Braun et Gautel, 2011). Enfin, l'activation de HDAC4 en réponse à une diminution chronique de l'innervation supprime l'expression de gènes de structure et de fonction contractile dépendants du facteur de transcription MEF-2 (myocyte enhancer factor-2) (Cohen et al., 2009). L'activation musculaire de HDAC4 pourrait donc être responsable de défauts contractiles importants et contribuer directement à la dysfonction musculaire observée dans la SLA.

Les inhibiteurs des HDAC : une piste thérapeutique dans la SLA ?

Nos résultats suggèrent que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de HDAC4 pourrait constituer une approche thérapeutique intéressante dans la SLA, pour améliorer les performances motrices et ralentir la progression de la maladie.

La régulation de la transcription génique fait intervenir des modifications de l'état de compaction de l'ADN, en particulier via des variations de condensation de la chromatine. Les mécanismes de décondensation de la chromatine incluent des modifications post-traductionnelles des histones de plusieurs types dont leur acétylation, qui est sous la dépendance de 2 groupes d'enzymes aux actions opposées, les acétyltransférases d'histone et les HDAC. Les HDAC retirent un groupement acétyl sur les lysines des queues amino-terminales des histones, restaurant leur port de charge et diminuant ainsi l'accessibilité de l'ADN. A ce jour, 18 HDAC ont été identifiées chez l'homme, réparties en 3 classes. HDAC4 appartient à la classe II (Mottet et Castronovo, 2008). Les maladies du motoneurone partagent des anomalies communes de régulation de la transcription et l'utilisation d'inhibiteurs des HDAC a déjà été proposée dans ce cadre, en particulier dans la SLA (Garbes et al., 2013). La diminution du niveau d'acétylation des histones au niveau des motoneurones a également été montrée dans un modèle murin de SLA (souris SOD1^{G86R}, exprimant une mutation de la SOD1 murine) (Rouaux et al., 2003). Les inhibiteurs des HDAC pourraient donc également contrecarrer cette hypoacétylation et l'initiation de l'apoptose qu'elle induit. Trois molécules inhibitrices des HDAC de classe II ont été testées dans des modèles animaux de SLA : le phénylbutyrate de sodium (PB), l'acide valproïque (VPA) et la trichostatine A (TSA). Le PB et le VPA ont également été utilisés dans le cadre d'essais thérapeutiques chez l'homme.

Le PB et le VPA sont des acides gras à chaîne courte, inhibiteurs des HDAC de classe I et IIa (Mottet et Castronovo, 2008). L'efficacité du PB a été évaluée chez la souris SOD1^{G93A} exprimant un nombre élevé de copies de la SOD1 mutée (Ryu et al., 2005). Dans ce modèle, l'injection quotidienne intrapéritonéale de PB diminuait la perte en motoneurones au niveau

de la moelle lombaire et améliorait les performances motrices des animaux. Le PB allongeait également la survie, de manière dose-dépendante, de près de 22% au maximum lorsque le traitement était débuté au stade présymptomatique. L'administration du PB augmentait le niveau d'acétylation des histones et diminuait également le relargage du cytochrome C, facteur pro-apoptotique, ainsi que l'activation des caspases. Le même groupe a évalué l'efficacité du PB en association avec le riluzole (seul traitement actuellement disponible dans la SLA), dans le même modèle SOD (Del Signore et al., 2009). Le traitement combiné prolongeait la survie de près de 22% et améliorait le phénotype clinique et neuropathologique, avec un effet synergique. La sécurité de l'administration du PB sur 20 semaines a été évaluée en 2009 dans un essai en ouvert (Cudkowicz et al., 2009). Parmi les 40 patients inclus, seuls 26 patients ont terminé l'étude. Près de 3 patients sur 4 étaient également sous traitement par riluzole. Les effets secondaires directement responsables d'une sortie prématurée de l'étude étaient, entre autres, des œdèmes et des troubles gastrointestinaux. L'administration de PB augmentait de façon significative le niveau d'acétylation des histones, même à la dose la plus faible testée. Le nombre de patients inclus et la durée de l'étude étaient par contre trop faibles pour pouvoir évaluer l'efficacité clinique du produit.

Le VPA est utilisé de longue date comme antiépileptique et thymorégulateur. Quatre études ont étudié l'effet du VPA dans un modèle murin de SLA (Sugai et al., 2004; Rouaux et al., 2007; Feng et al., 2008; Crochemore et al., 2009). Après avoir montré l'effet neuroprotecteur du VPA, en réponse à un stress glutamatergique, sur les motoneurons de la moelle lombaire (cultures organotypiques), Sugai et collaborateurs ont évalué son efficacité dans un modèle de souris SOD1^{G93A} exprimant un faible nombre de copies de la SOD1 humaine mutée. Dans cette étude, un traitement chronique par le VPA prolongeait significativement (d'environ 10%) la survie des souris, qu'il soit débuté au stade présymptomatique (j45) ou au moment de l'apparition des symptômes moteurs (Sugai et al., 2004). Rouaux et collaborateurs ont également retrouvé, chez la souris SOD1^{G86R}, un effet neuroprotecteur de l'administration chronique du VPA sur les motoneurons de la moelle lombaire, associé à une restauration du niveau d'acétylation des histones. Dans cette étude, l'administration chronique du VPA diminuait la proportion de JNM dénervées mais uniquement au stade précoce de l'atteinte motrice (j105) et retardait également l'apparition de l'atrophie musculaire, mais sans aucun effet sur la survie (Rouaux et al., 2007). Feng et collaborateurs ont montré que la combinaison d'un traitement par VPA et par lithium (stabilisateur de l'humeur), en administration biquotidienne intrapéritonéale dès le stade présymptomatique (j30), était plus efficace que chaque traitement en monothérapie pour prolonger la survie et améliorer le phénotype

clinique chez la souris SOD1^{G93A} exprimant un nombre élevé de copies de la SOD1 mutée (Feng et al., 2008). Enfin, Crochemore et collaborateurs ont observé un effet neuroprotecteur du VPA dans le même modèle SOD, mais sans effet sur la survie (Crochemore et al., 2009). Ces divergences de résultats sont possiblement à attribuer aux différences de modèles animaux et de nombre de copies exprimées de la mutation, le modèle utilisé par Sugai et al. présentant en effet une forme moins agressive de la maladie et une survie plus longue (9 mois contre 4,5 mois environ). La constatation d'une augmentation de la proportion de JNM innervées (même si modérée et présente uniquement au stade précoce de la pathologie) en cas de traitement par VPA est également intéressante. Ces résultats peuvent être rapprochés des travaux de Cui et collaborateurs qui ont montré que l'administration de VPA augmentait la régénération axonale et la réinnervation musculaire après axotomie sciatique chez le rat (Cui et al., 2003). Ces résultats ont conduit à la réalisation d'une étude de phase III visant à évaluer l'efficacité du traitement par VPA, en association avec le riluzole, chez 163 patients atteints de SLA (Piepers et al., 2009). Aux doses utilisées (similaires à celles employées dans l'épilepsie), le VPA était bien toléré mais sans efficacité sur la survie ou la progression de l'atteinte fonctionnelle.

La TSA est un inhibiteur puissant de la majorité des HDAC, ayant montré un effet sur de nombreuses lignées cellulaires (Mottet et Castronovo, 2008). L'efficacité d'un traitement par TSA a été testée chez la souris SOD^{G93A} (exprimant un nombre élevé de copies du transgène) (Yoo et Ko, 2011). Dans cette étude l'administration chronique de TSA, débutée après le début des symptômes (j90), diminuait de façon significative la perte en motoneurones au niveau de la moelle cervicale et lombaire et allongeait significativement la survie. Cet effet neuroprotecteur s'accompagnait d'une diminution de l'atrophie musculaire et d'une augmentation significative de la proportion de JNM innervées. Un effet similaire de la TSA sur l'innervation des JNM a également été rapporté chez la souris SMN Δ 7 SMA, modèle d'AMS, autre maladie du motoneurone liée à un déficit en protéine SMN1 (Ling et al., 2012). Ces résultats confirment l'intérêt potentiel de la TSA dans le traitement des maladies du motoneurone.

Effet modulateur potentiel de l'effort physique

A l'heure actuelle, l'effet de l'exercice physique sur la fonction motrice et sur la survie reste controversé dans la SLA, les travaux initialement publiés ayant rapporté un rôle délétère potentiel de l'exercice physique, en particulier dans les formes rapidement progressives (Sinaki et Mulder, 1978). Les différentes études réalisées depuis chez l'homme, en particulier

concernant le travail actif contre résistance, montrent des résultats contradictoires (de Almeida et al., 2012). Il s'agit d'études le plus souvent non randomisées et incluant un faible nombre de patients (Dalbello-Haas et al., 2008). Une étude randomisée récente, sur 27 patients, retrouvait un bénéfice fonctionnel (déclin moins marqué de l'ALSFRS à 6 mois) du travail actif contre résistance (comparé à des étirements seuls) (Bello-Haas et al., 2007). Même s'il s'agit vraisemblablement d'une population de patients sélectionnés, ces résultats sont intéressants. Il a en effet été montré récemment que l'exercice physique aérobie s'accompagnait d'une inactivation de l'action répressive de HDAC4 (et HDAC5) via leur exportation du noyau vers le cytoplasme (McGee et al., 2009). Il est donc envisageable qu'un effort physique adapté puisse favoriser le maintien de la réinnervation musculaire et donc de la fonction motrice, via la modulation de l'activité de HDAC4.

La cellule de Schwann terminale

A l'état normal, chaque axone terminal est coiffé par une cellule de Schwann terminale ou un de ses courts processus cytoplasmiques. Le nombre de cellules de Schwann terminales et le nombre et la taille des processus cytoplasmiques semblent stables en postnatal, en l'absence de dénervation. Le nombre de cellules de Schwann terminales par JNM paraît dépendre principalement, en postnatal, de la taille de la plaque motrice (O'Malley *et al.*, 1999). De façon précoce après dénervation expérimentale, chaque cellule de Schwann terminale émet des prolongements cytoplasmiques qui vont croître de façon importante. Certains de ces prolongements vont contacter la plaque motrice de JNM voisines, formant ainsi des "ponts" Schwanniens (O'Malley et al., 1999). Ces ponts Schwanniens vont permettre, lors du processus de réinnervation, le guidage des axones jusqu'à la gouttière synaptique dénervée (Son et Thompson, 1995; Son et al., 1996; O'Malley et al., 1999; Kang et al., 2003). En microscopie confocale, nous avons observé des prolongements cytoplasmiques au niveau de nombreuses cellules de Schwann terminales, évoquant ceux décrits après dénervation expérimentale. Cependant, nous n'avons pas objectivé de corrélation entre la proportion de JNM réinnervées et les modifications observées au niveau des cellules de Schwann terminales (en particulier avec le nombre moyen de prolongements par cellule de Schwann). Ceci est possiblement en rapport avec un nombre relativement important de données manquantes (impossibilité de déterminer avec précision le nombre de prolongements Schwanniens au niveau de certaines JNM, du fait de leur enchevêtrement).

Nous avons utilisé un Ac anti-S100 dirigé essentiellement contre la protéine S100B, qui est le principal membre de la famille S100 exprimé dans la cellule de Schwann terminale. Dans leur étude immunocytochimique sur coupes au cryostat à l'aide d'un Ac spécifiquement dirigé contre la protéine S100B, Liu et collaborateurs ont observé une diminution marquée de l'immunoréactivité S100 au niveau des JNM de patients atteints de SLA, touchant à la fois les muscles oculomoteurs et ceux des membres. Les auteurs interprétaient ce résultat comme une baisse d'expression de la protéine S100 plus que comme une absence de cellule de Schwann terminale, compte tenu du fait que l'immunoréactivité pour la GFAP et la protéine p75^{NTR} (autres marqueurs de la cellule de Schwann) était conservée, en particulier au niveau des muscles oculomoteurs. Cette diminution de l'immunoréactivité S100 n'est pas retrouvée dans notre étude réalisée au niveau de 2 muscles des membres supérieurs (deltoïde, anconé). Cette discordance de résultat pourrait être expliquée par des différences dans le stade évolutif de la maladie, l'étude de Liu et collaborateurs ayant été réalisée sur prélèvements autopsiques, donc au stade terminal de la maladie. La disparition quasi totale du marquage S100 a en effet été rapportée au niveau de JNM dénervées depuis plus d'un mois, en l'absence de réinnervation (O'Malley et al., 1999).

Nous avons également observé, en microscopie électronique, des aspects d'interposition de la membrane de la cellule de Schwann terminale entre la terminaison nerveuse et l'appareil sous-neural. Yoshihara et collaborateurs ont décrit le remplacement de la terminaison nerveuse par la cellule de Schwann terminale au niveau de JNM dénervées dans la SLA, mais n'ont pas rapporté cet aspect particulier d'interposition schwannienne (Yoshihara et al., 1998). Le rôle de la cellule de Schwann terminale dans la pathogénie de la SLA n'a été que très peu exploré jusqu'ici. Chez la souris SOD1m, Lobsiger et collaborateurs ont montré que, de façon inattendue, la suppression partielle du mutant SOD1 des cellules de Schwann s'accompagnait d'une accélération de la progression au cours de la phase tardive de la maladie (Lobsiger et al., 2009). Le mutant testé (SOD1^{G37R}) conservant une activité dismutase pleinement fonctionnelle, ces résultats sont en faveur d'une cascade oxydative déclenchée au sein de la cellule de Schwann au cours de l'évolution de la maladie, et potentiellement améliorée par l'élévation de l'activité dismutase. Dans le modèle utilisé, le niveau d'expression du transgène des cellules de Schwann *axonales* était réduit de 70% et celui des cellules de Schwann *terminales* de 40%. Le rôle propre de la cellule de Schwann *terminale* n'était pas précisément identifié. La cellule de Schwann terminale pourrait cependant contribuer aux différences de plasticité synaptique entre les différents types de JNM et expliquer la vulnérabilité précoce des synapses de type FF observée dans des modèles animaux de maladie du motoneurone. Il

existe ainsi des disparités importantes dans la capacité de bourgeonnement collatéral de l'axone moteur terminal après dénervation, en fonction du type de fibre musculaire. A l'inverse des axones de type S (innervant les fibres musculaires de type I), les axones moteurs des synapses de type FF (fibres musculaires de type IIb) possèdent une aptitude très limitée au bourgeonnement collatéral (Frey et al., 2000). Chez la souris SOD1m, les synapses de type FF sont également touchées de façon précoce et sélective par le processus de dénervation (Frey et al., 2000; Pun et al., 2006). La sémaphorine 3A, molécule de guidage chémo-répulsive inhibant la croissance axonale, est exprimée normalement au cours du développement. Il s'agit d'une glycoprotéine sécrétée, qui se lierait à certains composants de la lame basale synaptique, restreignant ainsi la permissivité à la croissance axonale dans le microenvironnement de la synapse. De Winter et collaborateurs ont montré que la sémaphorine 3A était exprimée, après dénervation, spécifiquement au sein des cellules de Schwann terminales des JNM de type FF. Chez la souris SOD1m, la sémaphorine 3A était également exprimée dans les cellules de Schwann terminales des JNM des fibres musculaires de type IIb (De Winter et al., 2006). Cette surexpression était quantitativement plus marquée au stade présymptomatique et au début des symptômes moteurs : la sécrétion de sémaphorine 3A par la cellule de Schwann terminale pourrait donc jouer un rôle dans la vulnérabilité précoce et sélective des UM de type FF.

Etude fonctionnelle des JNM

L'étude fonctionnelle des JNM a été réalisée en ENMG de surface chez tous les patients, lors de l'inclusion dans l'étude (réalisation du prélèvement musculaire) et 3 mois plus tard. Nous avons utilisé 2 techniques complémentaires : la SNR à basse fréquence et le test d'effort maximal bref. La SNR permet de détecter une altération de la TNM, sans préjuger de son origine pré- ou postsynaptique, lorsqu'elle met en évidence une baisse de l'amplitude et de la surface de la réponse motrice recueillie à la 5^{ème} stimulation : le décrétement, considéré comme cliniquement significatif lorsque son amplitude atteint 10% (Fournier, 1998). Pour tenir compte de l'hétérogénéité de l'atteinte motrice dans la SLA (Stalberg, 1982), nous avons analysé en SNR plusieurs nerfs de façon bilatérale, pour chaque patient : 3 nerfs au membre supérieur (nerf spinal, nerf cubital et nerf radial), un nerf au membre inférieur (nerf SPE) et le couple V-VII au niveau facial. Le test d'effort maximal bref permet d'apporter des arguments en faveur de l'origine présynaptique de l'atteinte de la TNM (Fournier, 1998). En cas d'atteinte

présynaptique de la TNM en rapport avec un défaut de libération du neurotransmetteur, on observe une augmentation de l'amplitude et de la surface de la réponse motrice recueillie immédiatement après la fin de l'exercice : l'incrément ou facilitation post-exercice, considéré comme significatif au delà de 20%. Le test d'effort bref a été réalisé sur un nerf du membre supérieur (nerf cubital) et un nerf du membre inférieur (nerf sciatique poplité interne), de façon bilatérale.

Un des objectifs initiaux de notre étude était également de réaliser des enregistrements microélectrophysiologiques *ex vivo*, en parallèle de l'analyse morphologique des JNM et de l'étude de la TNM en ENMG de surface. C'est pour cette raison que nous avons retenu initialement comme site de biopsie le muscle anconé, déjà utilisé dans cet objectif par d'autres équipes (Maselli et al., 1991). Malgré le prélèvement "de tendon à tendon" du fragment biopsique dans des conditions optimales, en milieu chirurgical, nous n'avons pas réussi à obtenir des enregistrements microélectrophysiologiques de bonne qualité sur les 3 premiers échantillons de muscle anconé que nous avons étudiés. En particulier, les potentiels de repos enregistrés au niveau du muscle étaient élevés, traduisant une probable altération de la membrane musculaire et la fuite d'électrolytes, rendant les enregistrements microélectrophysiologiques impraticables de façon fiable. Compte tenu, par ailleurs, des difficultés liées à la lourdeur de la procédure chirurgicale pour les patients, nous avons ensuite décidé d'utiliser le muscle deltoïde, muscle ne permettant pas la réalisation d'enregistrements microélectrophysiologiques mais utilisé en routine pour l'analyse morphologique des JNM. L'enregistrement en SNR du muscle deltoïde (innervé par le nerf axillaire, C5-C6) est techniquement difficile (artéfacts de mouvements importants) et inconfortable pour le patient (Misra et al., 2006). De ce fait, nous avons utilisé pour l'analyse en ENMG de surface un autre muscle proximal du membre supérieur, le trapèze, utilisé en routine pour la recherche d'altérations de la TNM, mais dont l'innervation métamérique est différente (nerf spinal accessoire et anastomoses des constituants radiculaires C2, C3 et C4 du plexus cervical) (Pu et al., 2008).

Nous avons retrouvé un décrétement $>10\%$ sur au moins un couple nerf-muscle chez 45% des patients lors de l'évaluation initiale et chez 33% des patients lors de l'évaluation au 3ème mois. Ce décrétement était d'amplitude modérée, en moyenne de 18% (11-26%). Nous n'avons pas mis en évidence de lien entre l'amplitude du décrétement et la durée d'évolution de la maladie, la sévérité de l'atteinte fonctionnelle motrice (score ALSFRS-R) ou le taux de progression de l'atteinte motrice au cours du suivi longitudinal. Ces résultats sont comparables

à ceux des études récentes (méthodologiquement similaires) réalisées sur le sujet (Killian et al., 1994; Wang et al., 2001; Kim et al., 2011; Yamashita et al., 2012). En accord avec les résultats de Killian et collaborateurs, nous n'avons pas mis en évidence de facilitation post-exercice - en faveur d'une atteinte de type présynaptique - au cours des tests d'effort maximal bref. La présence d'un décrétement significatif n'était pas corrélée, dans notre étude, avec une baisse de l'amplitude distale motrice au cours du suivi, contrairement aux résultats rapportés par Wang et collaborateurs. Cette discordance est potentiellement en rapport avec la différence de durée du suivi ENMG (18 mois dans le travail de Wang et collaborateurs). Comme dans d'autres études (Henderson et al., 2009; Yamashita et al., 2012), nous avons objectivé une corrélation négative significative entre l'amplitude du décrétement mesuré en SNR et l'amplitude motrice mesurée sur le nerf concerné : le décrétement mesuré était d'autant plus grand que l'amplitude motrice initiale (donc le nombre de fibres musculaires activées) était faible.

Plusieurs auteurs ont fait l'hypothèse d'un lien entre la survenue d'un décrétement significatif en SNR et le phénomène de réinnervation collatérale, du fait de l'"immaturité" des JNM réinnervées, dont les axones moteurs seraient incomplètement myélinisés aux stades précoces de la réinnervation (Stalberg, 1982; Wang et al., 2001). Nos résultats ne sont pas en faveur de cette hypothèse. Dans notre étude, l'amplitude du décrétement corrélait négativement avec la proportion de JNM réinnervées : le décrétement enregistré était d'autant plus faible que le pourcentage de JNM réinnervées était grand. Ce résultat doit cependant être interprété avec prudence pour les biopsies de muscle deltoïde (pour lesquelles nous ne disposions pas de l'enregistrement en SNR en recueil sur ce même muscle). Il n'est en effet pas possible d'exclure que la vulnérabilité à la maladie des motoneurons concernés soit très différente, pour un même patient, entre les muscles deltoïde et trapèze.

XIII. CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons réalisé une caractérisation morphologique complète de la JNM chez les patients atteints de SLA et montré que des anomalies majeures des JNM étaient présentes dans tous les cas, y compris aux stades précoces de la maladie. Certaines des modifications morphologiques des JNM que nous avons mises en évidence n'avaient jamais été rapportées en microscopie confocale. C'est le cas de l'aspect anormal de spiculation de la gouttière primaire visible au niveau d'un tiers des JNM, qui pourrait être en lien avec les épisodes itératifs de dénervation et réinnervation rencontrés dans les maladies du motoneurone. Cette hypothèse pourrait être confirmée par l'étude des JNM dans d'autres pathologies motoneuronales comme l'amyotrophie spinale ou le syndrome de Kennedy.

Nos résultats confirment les données de la littérature, obtenues à partir de modèles animaux de la maladie, sur le rôle de la JNM dans la physiopathologie de la SLA. Nous avons ainsi démontré qu'il existait des différences significatives d'innervation des JNM en fonction du profil d'évolution clinique (SLA d'évolution rapide versus SLA d'évolution lente) et que cette différence portait quantitativement sur la capacité à réinnover ou à maintenir cette réinnervation, alors que les caractéristiques qualitatives de l'innervation étaient globalement identiques. Nous avons également cherché à identifier les mécanismes moléculaires impliqués et mis en évidence le rôle délétère potentiel de HDAC4 musculaire dans la réinnervation musculaire, chez les patients présentant une SLA. D'autres molécules sont possiblement impliquées et devront être identifiées du fait de leur importance potentielle sur le plan thérapeutique.

XIV. BIBLIOGRAPHIE

AAEM. Literature review of the usefulness of repetitive nerve stimulation and single fiber EMG in the electrodiagnostic evaluation of patients with suspected myasthenia gravis or Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Muscle Nerve* 2001a; 24: 1239-1247.

AAEM. Practice parameter for repetitive nerve stimulation and single fiber EMG evaluation of adults with suspected myasthenia gravis or Lambert-Eaton myasthenic syndrome: summary statement. *Muscle Nerve* 2001b; 24: 1236-1238.

Abe K, Aoki M, Ikeda M, Watanabe M, Hirai S, Itoyama Y. Clinical characteristics of familial amyotrophic lateral sclerosis with Cu/Zn superoxide dismutase gene mutations. *J Neurol Sci* 1996; 136: 108-116.

Abrahams S, Leigh PN, Goldstein LH. Cognitive change in ALS: a prospective study. *Neurology* 2005; 64: 1222-1226.

Ackerley S, Grierson AJ, Brownlee J, Thornhill P, Anderton BH, Leigh PN *et al.* Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. *J Cell Biol* 2000; 150: 165-176.

Afifi AK, Aleu FP, Goodgold J, MacKay B. Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1966; 16: 475-481.

Al-Chalabi A, Jones A, Troakes C, King A, Al-Sarraj S, Van den Berg LH. The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2012; 124: 339-352.

Al-Sarraj S, King A, Troakes C, Smith B, Maekawa S, Bodi I *et al.* p62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTLN and MND/ALS. *Acta Neuropathol* 2011; 122: 691-702.

Aldunate R, Casar JC, Brandan E, Inestrosa NC. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 47: 96-104.

Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 2001; 57: 1282-1289.

Andersen PM, Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* 2011; 7: 603-615.

Andersen PM, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keranen ML, Tarvainen I, Haltia T *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995; 10: 61-66.

Andersen PM, Nilsson P, Keranen ML, Forsgren L, Hagglund J, Karlsborg M *et al.* Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia. *Brain* 1997; 120 (Pt 10): 1723-1737.

Anderson MJ, Cohen MW. Nerve-induced and spontaneous redistribution of acetylcholine receptors on cultured muscle cells. *J Physiol* 1977; 268: 757-773.

Aran FA. Recherches sur une maladie non encore décrite du système musculaire (atrophie musculaire progressive). Arch Gen Med 1850; 24: 172-214.

Argyriou AA, Polychronopoulos P, Papapetropoulos S, Ellul J, Andriopoulos I, Katsoulas G *et al.* Clinical and epidemiological features of motor neuron disease in south-western Greece. Acta Neurol Scand 2005; 111: 108-113.

Atsumi T. The ultrastructure of intramuscular nerves in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol 1981; 55: 193-198.

Bader D. Density and distribution of alpha-bungarotoxin-binding sites in postsynaptic structures of regenerated rat skeletal muscle. J Cell Biol 1981; 88: 338-345.

Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. Free Radic Biol Med 2010; 48: 629-641.

Beal MF, Richardson EP, Jr. Primary lateral sclerosis: a case report. Arch Neurol 1981; 38: 630-633.

Beghi E, Chio A, Couratier P, Esteban J, Hardiman O, Logroscino G *et al.* The epidemiology and treatment of ALS: focus on the heterogeneity of the disease and critical appraisal of therapeutic trials. Amyotroph Lateral Scler 2011; 12: 1-10.

Beghi E, Logroscino G, Chio A, Hardiman O, Mitchell D, Swingler R *et al.* The epidemiology of ALS and the role of population-based registries. Biochim Biophys Acta 2006; 1762: 1150-1157.

Beghi E, Mennini T, Bendotti C, Bigini P, Logroscino G, Chio A *et al.* The heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a possible explanation of treatment failure. Curr Med Chem 2007; 14: 3185-3200.

Bello-Haas VD, Florence JM, Kloos AD, Scheirbecker J, Lopate G, Hayes SM *et al.* A randomized controlled trial of resistance exercise in individuals with ALS. Neurology 2007; 68: 2003-2007.

Belzil VV, Rouleau GA. Familial ALS: less common than we think? J Neurol Neurosurg Psychiatry 2012; 83: 1133.

Benatar M. Lost in translation: treatment trials in the SOD1 mouse and in human ALS. Neurobiol Dis 2007; 26: 1-13.

Benatar M, Tandan R. The Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: have we put the cart before the horse? Muscle Nerve 2011; 43: 461-463.

Bergemalm D, Jonsson PA, Graffmo KS, Andersen PM, Brannstrom T, Rehnmark A *et al.* Overloading of stable and exclusion of unstable human superoxide dismutase-1 variants in mitochondria of murine amyotrophic lateral sclerosis models. J Neurosci 2006; 26: 4147-4154.

Berman HA, Decker MM, Jo S. Reciprocal regulation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in mammalian skeletal muscle. Dev Biol 1987; 120: 154-161.

Bernstein LP, Antel JP. Motor neuron disease: decremental responses to repetitive nerve stimulation. *Neurology* 1981; 31: 204-207.

Bezakova G, Ruegg MA. New insights into the roles of agrin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 295-308.

Bjornskov EK, Dekker NP, Norris FH, Jr., Stuart ME. End-plate morphology in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 1975; 32: 711-712.

Bjornskov EK, Norris FH, Jr., Mower-Kuby J. Quantitative axon terminal and end-plate morphology in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 1984; 41: 527-530.

Blondet B, Carpentier G, Ferry A, Chatonnet A, Courty J. Localization of butyrylcholinesterase at the neuromuscular junction of normal and acetylcholinesterase knockout mice. *J Histochem Cytochem* 2010; 58: 1075-1082.

Boekestein WA, Kleine BU, Hageman G, Schelhaas HJ, Zwarts MJ. Sensitivity and specificity of the 'Awaji' electrodiagnostic criteria for amyotrophic lateral sclerosis: retrospective comparison of the Awaji and revised El Escorial criteria for ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 2010; 11: 497-501.

Boillee S, Peschanski M, Junier MP. The wobbler mouse: a neurodegeneration jigsaw puzzle. *Mol Neurobiol* 2003; 28: 65-106.

Boillee S, Vande VC, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 2006a; 52: 39-59.

Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G *et al.* Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006b; 312: 1389-1392.

Borchelt DR, Guarnieri M, Wong PC, Lee MK, Slunt HS, Xu ZS *et al.* Superoxide dismutase 1 subunits with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis do not affect wild-type subunit function. *J Biol Chem* 1995; 270: 3234-3238.

Borchelt DR, Wong PC, Becher MW, Pardo CA, Lee MK, Xu ZS *et al.* Axonal transport of mutant superoxide dismutase 1 and focal axonal abnormalities in the proximal axons of transgenic mice. *Neurobiol Dis* 1998; 5: 27-35.

Bossy J, Collège Médical Français des Professeurs d'Anatomie. *Anatomie clinique 4: Neuro-anatomie*. Paris: Springer Verlag; 1990.

Bostock H, Sharief MK, Reid G, Murray NM. Axonal ion channel dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 1995; 118 (Pt 1): 217-225.

Bouteloup C, Desport JC, Clavelou P, Guy N, Derumeaux-Burel H, Ferrier A *et al.* Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. *J Neurol* 2009; 256: 1236-1242.

Brain WR. *Diseases of the Nervous System*. Oxford: Oxford University Press; 1962.

Braun T, Gautel M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 349-361.

Brody JA, Stanhope JM, Kurland LT. Patterns of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Parkinsonism-Dementia on Guam. *Contemp Neurol Ser* 1975; 12: 45-70.

Brooke MH, Kaiser KK. Some comments on the histochemical characterization of muscle adenosine triphosphatase. *J Histochem Cytochem* 1969; 17: 431-432.

Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci* 1994; 124 Suppl: 96-107.

Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000; 1: 293-299.

Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG *et al.* ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 1997; 18: 327-338.

Bruneteau G, Simonet T, Bauche S, Mandjee N, Malfatti E, Girard E *et al.* Muscle histone deacetylase 4 upregulation in amyotrophic lateral sclerosis: potential role in reinnervation ability and disease progression. *Brain* 2013; 136: 2359-2368

Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J Physiol* 1960; 150: 417-439.

Burgunder JM, Schols L, Baets J, Andersen P, Gasser T, Szolnoki Z *et al.* EFNS guidelines for the molecular diagnosis of neurogenetic disorders: motoneuron, peripheral nerve and muscle disorders. *Eur J Neurol* 2011; 18: 207-217.

Burrow JN, Blumbergs PC. Substantia nigra degeneration in motor neurone disease: a quantitative study. *Aust N Z J Med* 1992; 22: 469-472.

Byrne S, Elamin M, Bede P, Hardiman O. Absence of consensus in diagnostic criteria for familial neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012a; 83: 365-367.

Byrne S, Elamin M, Bede P, Shatunov A, Walsh C, Corr B *et al.* Cognitive and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9orf72 repeat expansion: a population-based cohort study. *Lancet Neurol* 2012b; 11: 232-240.

Byrne S, Walsh C, Lynch C, Bede P, Elamin M, Kenna K *et al.* Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82: 623-627.

Calvo A, Moglia C, Balma M, Chio A. Involvement of immune response in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis: a therapeutic opportunity ? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010; 9: 325-330.

Camu W, Khoris J, Moulard B, Salachas F, Briolotti V, Rouleau GA *et al.* Genetics of familial ALS and consequences for diagnosis. French ALS Research Group. J Neurol Sci 1999; 165 Suppl 1: S21-S26.

Carrasco DI, Bichler EK, Seburn KL, Pinter MJ. Nerve terminal degeneration is independent of muscle fiber genotype in SOD1 mice. PLoS One 2010; 5: e9802.

Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. J Neurosci 1996; 16: 4069-4079.

Castonguay A, Levesque S, Robitaille R. Glial cells as active partners in synaptic functions. Prog Brain Res 2001; 132: 227-240.

Castonguay A, Robitaille R. Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca²⁺ internal stores at the neuromuscular synapse. J Neurosci 2001; 21: 1911-1922.

Cavallo M, Adenzato M, Macpherson SE, Karwig G, Enrici I, Abrahams S. Evidence of social understanding impairment in patients with amyotrophic lateral sclerosis. PLoS One 2011; 6: e25948.

Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B *et al.* The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). J Neurol Sci 1999; 169: 13-21.

Cervenakova L, Protas II, Hirano A, Votikov VI, Nedzved MK, Kolomiets ND *et al.* Progressive muscular atrophy variant of familial amyotrophic lateral sclerosis (PMA/ALS). J Neurol Sci 2000; 177: 124-130.

Charcot JB. Contribution à l'étude de l'atrophie musculaire progressive type Duchenne-Aran. 1895.

Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antéro-latéraux de la moelle épinière. 1869. p. 354-67.

Cheah BC, Vucic S, Krishnan AV, Kiernan MC. Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. Curr Med Chem 2010; 17: 1942-199.

Chen-Plotkin AS, Lee VM, Trojanowski JQ. TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. Nat Rev Neurol 2010; 6: 211-220.

Chevessier F, Faraut B, Ravel-Chapuis A, *et al.* MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. Hum Mol Genet 2004; 13:3229-3240.

Chio A, Borghero G, Restagno G, Mora G, Drepper C, Traynor BJ *et al.* Clinical characteristics of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the pathogenic GGGGCC hexanucleotide repeat expansion of C9ORF72. Brain 2012; 135: 784-793.

Chio A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E *et al.* Prognostic factors in ALS: A critical review. Amyotroph Lateral Scler 2009; 10: 310-323.

Chou SM. Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis: new perspectives on an old disease. J Formos Med Assoc 1997; 96: 488-498.

Cifuentes-Diaz C, Nicole S, Velasco ME, Borra-Cebrian C, Panozzo C, Frugier T *et al.* Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1439-1447.

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M *et al.* Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 2003; 302: 113-117.

Coërs C. [Histological aspects of neuromuscular regeneration during various diseases of the peripheral motor neuron; collateral regeneration in humans]. *Acta Neurol Psychiatr Belg* 1955; 55: 23-30.

Coërs C, Woolf AL. The innervation of muscle. A biopsy study. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd; 1959.

Cohen TJ, Barrientos T, Hartman ZC, Garvey SM, Cox GA, Yao TP. The deacetylase HDAC4 controls myocyte enhancing factor-2-dependent structural gene expression in response to neural activity. *FASEB J* 2009; 23: 99-106.

Cohen TJ, Waddell DS, Barrientos T, Lu Z, Feng G, Cox GA *et al.* The histone deacetylase HDAC4 connects neural activity to muscle transcriptional reprogramming. *J Biol Chem* 2007; 282: 33752-33759.

Corrado L, Battistini S, Penco S, Bergamaschi L, Testa L, Ricci C *et al.* Variations in the coding and regulatory sequences of the angiogenin (ANG) gene are not associated to ALS (amyotrophic lateral sclerosis) in the Italian population. *J Neurol Sci* 2007; 258: 123-127.

Couteaux R. Motor endplate structure. In: Bourne G, editor. *Structure and function of muscle*. Volume 2. New York: 1973. p. 483-530.

Couteaux R, Mira JC, d'Albis A. Regeneration of muscles after cardiotoxin injury. I. Cytological aspects. *Biol Cell* 1988; 62: 171-182.

Couteaux R, Pecot-Dechavassine M. [Specialized areas of presynaptic membranes]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1974; 278: 291-293.

Cox PA, Richer R, Metcalf JS, Banack SA, Codd GA, Bradley WG. Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: a possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans. *Amyotroph Lateral Scler* 2009; 10 Suppl 2: 109-117.

Crochemore C, Virgili M, Bonamassa B, Canistro D, Pena-Altamira E, Paolini M *et al.* Long-term dietary administration of valproic acid does not affect, while retinoic acid decreases, the lifespan of G93A mice, a model for amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2009; 39: 548-552.

Cruveilhier J. Sur la paralysie musculaire progressive atrophique. *Arch Gen Med* 1853; 91: 561-603.

Cudkowicz ME, Andres PL, Macdonald SA, Bedlack RS, Choudry R, Brown RH, Jr. *et al.* Phase 2 study of sodium phenylbutyrate in ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 2009; 10: 99-106.

Cui SS, Yang CP, Bowen RC, Bai O, Li XM, Jiang W *et al.* Valproic acid enhances axonal regeneration and recovery of motor function after sciatic nerve axotomy in adult rats. *Brain Res* 2003; 975: 229-236.

Dalbello-Haas V, Florence JM, Krivickas LS. Therapeutic exercise for people with amyotrophic lateral sclerosis or motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; CD005229.

Dale HH, Feldberg W, Vogt M. Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J Physiol* 1936; 86: 353-380.

Dantes M, McComas A. The extent and time course of motoneuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 1991; 14: 416-421.

Davidson Y, Kelley T, Mackenzie IR, Pickering-Brown S, Du PD, Neary D *et al.* Ubiquitinated pathological lesions in frontotemporal lobar degeneration contain the TAR DNA-binding protein, TDP-43. *Acta Neuropathol* 2007; 113: 521-533.

De Almeida JP, Silvestre R, Pinto AC, de CM. Exercise and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Sci* 2012; 33: 9-15.

De Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J *et al.* Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol* 2008; 119: 497-503.

De Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J *et al.* The Awaji criteria for diagnosis of ALS. *Muscle Nerve* 2011; 44: 456-457.

De Winter F, Vo T, Stam FJ, Wisman LA, Bar PR, Niclou SP *et al.* The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Mol Cell Neurosci* 2006; 32: 102-117.

De Vos K, Severin F, Van HF, Vancompernelle K, Goossens V, Hyman A *et al.* Tumor necrosis factor induces hyperphosphorylation of kinesin light chain and inhibits kinesin-mediated transport of mitochondria. *J Cell Biol* 2000; 149: 1207-1214.

Dejesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ *et al.* Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72: 245-256.

Del Castillo J, KATZ B. Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 1954; 124: 560-573.

Del Signore SJ, Amante DJ, Kim J, Stack EC, Goodrich S, Cormier K *et al.* Combined riluzole and sodium phenylbutyrate therapy in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Amyotroph Lateral Scler* 2009; 10: 85-94.

Deng HX, Zhai H, Bigio EH, Yan J, Fecto F, Ajroud K *et al.* FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 67: 739-748.

Dengler R, Konstanzer A, Hesse S, Schubert M, Wolf W. Collateral nerve sprouting and twitch forces of single motor units in conditions with partial denervation in man. *Neurosci Lett* 1989; 97: 118-122.

Denys EH, Norris FH, Jr. Amyotrophic lateral sclerosis. Impairment of neuromuscular transmission. *Arch Neurol* 1979; 36: 202-205.

Desport JC, Preux PM, Magy L, Boirie Y, Vallat JM, Beaufriere B *et al.* Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Clin Nutr* 2001; 74: 328-334.

Desport JC, Torny F, Lacoste M, Preux PM, Couratier P. Hypermetabolism in ALS: correlations with clinical and paraclinical parameters. *Neurodegener Dis* 2005; 2: 202-207.

Devenney E, Hornberger M, Irish M, Mioshi E, Burrell J, Tan R *et al.* Frontotemporal Dementia Associated With the C9ORF72 Mutation: A Unique Clinical Profile. *JAMA Neurol* 2014.

Donahue SP, Wood JG, English AW. On the role of the 200-kDa neurofilament protein at the developing neuromuscular junction. *Dev Biol* 1988; 130: 154-166.

Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, di Scala F, Rene F, de Tapia M, Pradat PF *et al.* Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2002; 10: 358-365.

Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Eschbach J, Rene F, Oudart H *et al.* Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS One* 2009; 4: e5390.

Dupuis L, Oudart H, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11159-11164.

Eisen A, Weber M. The motor cortex and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2001; 24: 564-573.

Elliott JL. Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 95: 172-178.

Erb WH. Uber einen wenig bekannten Spinalen Symptomen complex. *Berl Klein Wschr* 1875; 12: 357-359.

Evers J, Laser M, Sun YA, Xie ZP, Poo MM. Studies of nerve-muscle interactions in *Xenopus* cell culture: analysis of early synaptic currents. *J Neurosci* 1989; 9: 1523-1539.

Falconer DS. Wobbler (wr). *Mouse News Lett* 1956; 15-22.

Feng HL, Leng Y, Ma CH, Zhang J, Ren M, Chuang DM. Combined lithium and valproate treatment delays disease onset, reduces neurological deficits and prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Neuroscience* 2008; 155: 567-572.

Fernandez HL, Stiles JR, Donoso JA. Skeletal muscle acetylcholinesterase molecular forms in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 1986; 9: 399-406.

Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2011; 7: 616-630.

Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, Meininger V, Dib M, Rouleau GA *et al.* Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1757-1761.

Fischbach GD, Cohen SA. The distribution of acetylcholine sensitivity over uninnervated and innervated muscle fibers grown in cell culture. *Dev Biol* 1973; 31: 147-162.

Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 2004; 185: 232-240.

Fisher CM. Pure spastic paralysis of corticospinal origin. *Can J Neurol Sci* 1977; 4: 251-258.

Flanagan-Steet H, Fox MA, Meyer D, Sanes JR. Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development* 2005; 132: 4471-4481.

Fournier E. Examen électromyographique et étude de la conduction nerveuse, sémiologie électrophysiologique. Cachan: Editions médicales internationales; 1998.

Fox MA, Sanes JR, Borza DB, Eswarakumar VP, Fassler R, Hudson BG *et al.* Distinct target-derived signals organize formation, maturation, and maintenance of motor nerve terminals. *Cell* 2007; 129: 179-193.

Frank E, Fischbach GD. Early events in neuromuscular junction formation in vitro: induction of acetylcholine receptor clusters in the postsynaptic membrane and morphology of newly formed synapses. *J Cell Biol* 1979; 83: 143-158.

Frank E, Gautvik K, Sommerschild H. Persistence of junctional acetylcholine receptors following denervation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1976; 40: 275-281.

Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* 2000; 20: 2534-2542.

Garbes L, Riessland M, Wirth B. Histone acetylation as a potential therapeutic target in motor neuron degenerative diseases. *Curr Pharm Des* 2013.

Gendron TF, Belzil VV, Zhang YJ, Petrucelli L. Mechanisms of toxicity in C9FTLD/ALS. *Acta Neuropathol* 2014.

Gesemann M, Denzer AJ, Ruegg MA. Acetylcholine receptor-aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *J Cell Biol* 1995; 128: 625-636.

Gil J, Funalot B, Torny F, Lacoste M, Couratier P. [Exogenous risk factors in sporadic ALS: a review of the literature]. *Rev Neurol (Paris)* 2007; 163: 1021-1030.

- Girard E, Bernard V, Camp S, Taylor P, Krejci E, Molgo J. Remodeling of the neuromuscular junction in mice with deleted exons 5 and 6 of acetylcholinesterase. *J Mol Neurosci* 2006; 30: 99-100.
- Girard E, Bernard V, Minic J, Chatonnet A, Krejci E, Molgo J. Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice. *Life Sci* 2007; 80: 2380-2385.
- Grohme K, Maravic MV, Gasser T, Borasio GD. A case of amyotrophic lateral sclerosis with a very slow progression over 44 years. *Neuromuscul Disord* 2001; 11: 414-416.
- Gros-Louis F, Lariviere R, Gowing G, Laurent S, Camu W, Bouchard JP *et al.* A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 45951-45956.
- Guegan C, Vila M, Rosoklija G, Hays AP, Przedborski S. Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 2001; 21: 6569-6576.
- Gunnarsson LG, Lindberg G, Soderfeldt B, Axelson O. Amyotrophic lateral sclerosis in Sweden in relation to occupation. *Acta Neurol Scand* 1991; 83: 394-398.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994; 264: 1772-1775.
- Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annuar A, Bowen S *et al.* Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 2003; 300: 808-812.
- Haley RW. Excess incidence of ALS in young Gulf War veterans. *Neurology* 2003; 61: 750-756.
- Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 1998; 23: 249-256.
- Hansen S, Ballantyne JP. A quantitative electrophysiological study of motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1978; 41: 773-783.
- Hegedus J, Putman CT, Gordon T. Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2007; 28: 154-164.
- Hegedus J, Putman CT, Tyreman N, Gordon T. Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 2008; 586: 3337-3351.
- Heiman-Patterson TD, Deitch JS, Blankenhorn EP, Erwin KL, Perreault MJ, Alexander BK *et al.* Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)1Gur mouse model of ALS. *J Neurol Sci* 2005; 236: 1-7.
- Henderson R, Baumann F, Hutchinson N, McCombe P. CMAP decrement in ALS. *Muscle Nerve* 2009; 39: 555-556.

Henkel JS, Engelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T *et al.* Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 2004; 55: 221-235.

Higashihara M, Sonoo M, Imafuku I, Fukutake T, Kamakura K, Inoue K *et al.* Fasciculation potentials in amyotrophic lateral sclerosis and the diagnostic yield of the Awaji algorithm. *Muscle Nerve* 2012; 45: 175-182.

Higgins CM, Jung C, Ding H, Xu Z. Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci* 2002; 22: RC215.

Highstone HH, Colton RP, Norris FH. Amyotrophic Lateral Sclerosis: changes in motor nerve terminal function. *Recent Advances in Myology* 1975; 542-545.

Hodges J. Familial frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis associated with the C9ORF72 hexanucleotide repeat. *Brain* 2012; 135: 652-655.

Horner RD, Kamins KG, Feussner JR, Grambow SC, Hoff-Lindquist J, Harati Y *et al.* Occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War veterans. *Neurology* 2003; 61: 742-749.

Hrabovska A, Bernard V, Krejci E. A novel system for the efficient generation of antibodies following immunization of unique knockout mouse strains. *PLoS One* 2010; 5: e12892.

Huang C, Zhou H, Tong J, Chen H, Liu YJ, Wang D *et al.* FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *PLoS Genet* 2011; 7: e1002011.

Huze C, Bauche S, Richard P, Chevessier F, Goillot E, Gaudon K *et al.* Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 155-167.

Ince P.G., Lowe J., Shaw P.J. Amyotrophic lateral sclerosis: current issues in classification, pathogenesis and molecular pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; 24: 104-117.

Ince PG. Neuropathology. In: Robert H.Brown, Meininger V, Swash M, editors. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. London: Martin Dunitz; 2000. p. 83-112.

Ishigaki K, Nicolle D, Krejci E, *et al.* Two novel mutations in the COLQ gene cause endplate acetylcholinesterase deficiency. *Neuromuscul Disord* 2003; 13:236-244.

Iwanami T, Sonoo M, Hatanaka Y, Hokkoku K, Oishi C, Shimizu T. Decremental responses to repetitive nerve stimulation (RNS) in motor neuron disease. *Clin Neurophysiol* 2011; 122: 2530-2536.

Jackson M, Lowe J. The new neuropathology of degenerative frontotemporal dementias. *Acta Neuropathol* 1996; 91: 127-134.

Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Dimou L, Lin S, Fergani A, Ruegg MA *et al.* The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep* 2006; 7: 1162-1167.

Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Pradat PF, Dupuis L, Echaniz-Laguna A, Muller A *et al.* Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann Neurol* 2005; 57: 553-556.

Kang H, Tian L, Thompson W. Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. *J Neurocytol* 2003; 32: 975-985.

Kato S. Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 2008; 115: 97-114.

Kato S, Oda M, Tanabe H. Diminution of dopaminergic neurons in the substantia nigra of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993; 19: 300-304.

Kato T, Katagiri T, Hirano A, Kawanami T, Sasaki H. Lewy body-like hyaline inclusions in sporadic motor neuron disease are ubiquitinated. *Acta Neuropathol* 1989; 77: 391-396.

Katz B, Miledi R. The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1965; 161: 496-503.

Kawamura Y, Dyck PJ, Shiono M, Okazaki H, Tateishi J, Doi H. Morphometric comparison of the vulnerability of peripheral motor and sensory neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1981; 40: 667-675.

Kawashima T, Kikuchi H, Takita M, Doh-ura K, Ogomori K, Oda M *et al.* Skein-like inclusions in the neostriatum from a case of amyotrophic lateral sclerosis with dementia. *Acta Neuropathol* 1998; 96: 541-545.

Kennel PF, Finiels F, Revah F, Mallet J. Neuromuscular function impairment is not caused by motor neurone loss in FALS mice: an electromyographic study. *Neuroreport* 1996; 7: 1427-1431.

Kew JJM, Leigh PN. Dementia with motor neuron disease. In: Rossor MN, editor. *Unusual dementia*. London: Bailliere Tindall; 1992. p. 611-26.

Killian JM, Wilfong AA, Burnett L, Appel SH, Boland D. Decremental motor responses to repetitive nerve stimulation in ALS. *Muscle Nerve* 1994; 17: 747-754.

Kim JY, Park KD, Kim SM, Sunwoo IN. Repetitive nerve stimulation test in amyotrophic lateral sclerosis with predominant oropharyngeal manifestations. *J Clin Neurol* 2011; 7: 31-33.

Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, Hallock PT, Gomez AM, Huang JH *et al.* Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* 2008; 135: 334-342.

King AE, Dickson TC, Blizzard CA, Foster SS, Chung RS, West AK *et al.* Excitotoxicity mediated by non-NMDA receptors causes distal axonopathy in long-term cultured spinal motor neurons. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 2151-2159.

Koëlle GB, Friedenwald JA. A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949; 70: 617-622.

Koppers M., van Es M., van den Berg L.H., Veldink J.H., Pasterkamp R.J. Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. 2013.

Kumai Y, Ito T, Matsukawa A, Yumoto E. Effects of denervation on neuromuscular junctions in the thyroarytenoid muscle. *Laryngoscope* 2005; 115: 1869-1872.

Kummer TT, Misgeld T, Sanes JR. Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16: 74-82.

Kurland LT, Mulder DW. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geographic distribution and special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations. *Neurology* 1954a; 4: 438-448.

Kurland LT, Mulder DW. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geographic distribution, with special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations. *Neurology* 1954b; 4: 355-378.

Kuroda M, Sok J, Webb L, Baechtold H, Urano F, Yin Y *et al.* Male sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS(-/-) mice. *EMBO J* 2000; 19: 453-462.

Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, LeClerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C *et al.* Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009; 323: 1205-1208.

Kwong LK, Neumann M, Sampathu DM, Lee VM, Trojanowski JQ. TDP-43 proteinopathy: the neuropathology underlying major forms of sporadic and familial frontotemporal lobar degeneration and motor neuron disease. *Acta Neuropathol* 2007; 114: 63-70.

Laaksovirta H, Peuralinna T, Schymick JC, Scholz SW, Lai SL, Myllykangas L *et al.* Chromosome 9p21 in amyotrophic lateral sclerosis in Finland: a genome-wide association study. *Lancet Neurol* 2010; 9: 978-985.

Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 1996; 347: 1425-1431.

Lagier-Tourenne C, Baughn M, Rigo F, Sun S, Liu P, Li HR *et al.* Targeted degradation of sense and antisense C9orf72 RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: E4530-E4539.

Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 2010; 19: R46-R64.

LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, Shelly SS, Ascano J, Tokito M *et al.* Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* 2002; 34: 715-727.

Le Bigot P. Contribution à l'étude neuropathologique de la sclérose latérale amyotrophique et au problème de ses limites nosologiques (à propos de 56 observations anatomocliniques). Thèse de Médecine, Paris.; 1972.

Le Forestier N, Maissonobe T, Piquard A, Rivaud S, Crevier-Buchman L, Salachas F *et al.* Does primary lateral sclerosis exist? A study of 20 patients and a review of the literature. *Brain* 2001; 124: 1989-1999.

Leigh PN, Anderton BH, Dodson A, Gallo JM, Swash M, Power DM. Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease. *Neurosci Lett* 1988; 93: 197-203.

Leigh PN, Whitwell H, Garofalo O, Buller J, Swash M, Martin JE *et al.* Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain* 1991; 114 (Pt 2): 775-788.

Levano S, Ginz H, Siegemund M, Filipovic M, Voronkov E, Urwyler A *et al.* Genotyping the butyrylcholinesterase in patients with prolonged neuromuscular block after succinylcholine. *Anesthesiology* 2005; 102: 531-535.

Lin W, Burgess RW, Dominguez B, Pfaff SL, Sanes JR, Lee KF. Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 2001; 410: 1057-1064.

Ling KK, Gibbs RM, Feng Z, Ko CP. Severe neuromuscular denervation of clinically relevant muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 185-195.

Lino MM, Schneider C, Caroni P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* 2002; 22: 4825-4832.

Liu JX, Brannstrom T, Andersen PM, Pedrosa-Domellof F. Distinct changes in synaptic protein composition at neuromuscular junctions of extraocular muscles versus limb muscles of ALS donors. *PLoS One* 2013; 8: e57473.

Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, Yamanaka K *et al.* Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 4465-4470.

Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio' A, Couratier P, Mitchell JD *et al.* Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 6-11.

Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio A, Mitchell D, Swingler RJ *et al.* Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81: 385-390.

Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller B. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* 2002; 59: 1077-1079.

Lomen-Hoerth C, Murphy J, Langmore S, Kramer JH, Olney RK, Miller B. Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal? *Neurology* 2003; 60: 1094-1097.

Lowe J. New pathological findings in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1994; 124 Suppl: 38-51.

Mackenzie IR, Arzberger T, Kremmer E, Troost D, Lorenzl S, Mori K *et al.* Dipeptide repeat protein pathology in C9ORF72 mutation cases: clinico-pathological correlations. *Acta Neuropathol* 2013; 126: 859-879.

Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ *et al.* Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 2007; 61: 427-434.

Maekawa S, Leigh PN, King A, Jones E, Steele JC, Bodi I *et al.* TDP-43 is consistently co-localized with ubiquitinated inclusions in sporadic and Guam amyotrophic lateral sclerosis but not in familial amyotrophic lateral sclerosis with and without SOD1 mutations. *Neuropathology* 2009; 29: 672-683.

Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S *et al.* Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012; 11: 323-330.

Manfredi G, Xu Z. Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion* 2005; 5: 77-87.

Manuel M, Zytnicki D. Alpha, beta and gamma motoneurons: functional diversity in the motor system's final pathway. *J Integr Neurosci* 2011; 10: 243-276.

Martin LJ. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 459-471.

Martin N, Jaubert J, Gounon P, Salido E, Haase G, Szatanik M *et al.* A missense mutation in Tbc causes progressive motor neuronopathy in mice. *Nat Genet* 2002; 32: 443-447.

Maselli RA, Mass DP, Distad BJ, Richman DP. Anconeus muscle: a human muscle preparation suitable for in-vitro microelectrode studies. *Muscle Nerve* 1991; 14: 1189-1192.

Maselli RA, Wollman RL, Leung C, Distad B, Palombi S, Richman DP *et al.* Neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 1993; 16: 1193-1203.

Massoulie J, Millard CB. Cholinesterases and the basal lamina at vertebrate neuromuscular junctions. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9: 316-325.

Mateen FJ, Carone M, Sorenson EJ. Patients who survive 5 years or more with ALS in Olmsted County, 1925-2004. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81: 1144-1146.

Mather K, Martin JE, Swash M, Vowles G, Brown A, Leigh PN. Histochemical and immunocytochemical study of ubiquitinated neuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993; 19: 141-145.

McComas AJ, Galea V, de Bruin H. Motor unit populations in healthy and diseased muscles. *Phys Ther* 1993; 73: 868-877.

McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M. Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. *J Physiol* 2009; 587: 5951-5958.

McGeer PL, McGeer EG. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2002; 26: 459-470.

McGoldrick P, Joyce PI, Fisher EM, Greensmith L. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2013.

Meininger V. Breaking bad news in amyotrophic lateral sclerosis. *Palliat Med* 1993; 7: 37-40.

Migheli A, Attanasio A, Schiffer D. Ubiquitin and neurofilament expression in anterior horn cells in amyotrophic lateral sclerosis: possible clues to the pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994; 20: 282-289.

Migheli A, Pezzulo T, Attanasio A, Schiffer D. Peripherin immunoreactive structures in amyotrophic lateral sclerosis. *Lab Invest* 1993; 68: 185-191.

Millecamps S, Boillee S, Le B, I, Seilhean D, Teyssou E, Giraudeau M *et al.* Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in C9ORF72 and patients with mutations in other ALS-related genes. *J Med Genet* 2012; 49: 258-263.

Millecamps S, Salachas F, Cazeneuve C, Gordon P, Bricka B, Camuzat A *et al.* SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet* 2010; 47: 554-560.

Miller TM, Kim SH, Yamanaka K, Hester M, Umapathi P, Arnson H *et al.* Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 19546-19551.

Misgeld T, Kummer TT, Lichtman JW, Sanes JR. Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 11088-11093.

Misra UK, Kalita J, Srivastava A. A study of diagnostic yield, technical ease and patient discomfort of low rate repetitive nerve stimulation test in patients with myasthenia gravis. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 2006; 46: 337-341.

Mitchell JC, McGoldrick P, Vance C, Hortobagyi T, Sreedharan J, Rogelj B *et al.* Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathol* 2013; 125: 273-288.

Mitsumoto H, Chad DA, Pioro EP. Clinical features: signs and symptoms. In: Mitsumoto H, Chad DA, Pioro EP, editors. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Philadelphia: FA Davis Company; 1998a. p. 47-64.

Mitsumoto H, Chad DA, Pioro EP. History, terminology and classification of ALS. In: Mitsumoto H, Chad DA, Pioro EP, editors. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Philadelphia: FA Davis Company; 1998b. p. 3-17.

Mitsumoto H, Santella RM, Liu X, Bogdanov M, Zipprich J, Wu HC *et al.* Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 2008; 9: 177-183.

Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K. Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2006; 112: 597-603.

Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Okamoto K. Peripherin partially localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2011; 302: 14-18.

Moresi V, Williams AH, Meadows E, Flynn JM, Potthoff MJ, McAnally J *et al.* Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell* 2010; 143: 35-45.

Mori K, Weng SM, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E *et al.* The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTLD/ALS. *Science* 2013; 339: 1335-1338.

Moser JM, Bigini P, Schmitt-John T. The wobbler mouse, an ALS animal model. *Mol Genet Genomics* 2013.

Mottet D, Castronovo V. [Histone deacetylases: a new class of efficient anti-tumor drugs]. *Med Sci (Paris)* 2008; 24: 742-746.

Mulder DW, Lambert EH, Eaton LM. Myasthenic syndrome in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1959; 9: 627-631.

Muller FL, Song W, Liu Y, Chaudhuri A, Pieke-Dahl S, Strong R *et al.* Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1993-2004.

Murakami T, Nagano I, Hayashi T, Manabe Y, Shoji M, Setoguchi Y *et al.* Impaired retrograde axonal transport of adenovirus-mediated E. coli LacZ gene in the mice carrying mutant SOD1 gene. *Neurosci Lett* 2001; 308: 149-152.

Murch SJ, Cox PA, Banack SA. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 12228-12231.

Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H *et al.* Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 2007; 10: 615-622.

Narai H, Manabe Y, Nagai M, Nagano I, Ohta Y, Murakami T *et al.* Early detachment of neuromuscular junction proteins in ALS mice with SODG93A mutation. *Neurol Int* 2009; 1: e16.

Naumenko N, Pollari E, Kurronen A, Giniatullina R, Shakirzyanova A, Magga J *et al.* Gender-Specific Mechanism of Synaptic Impairment and Its Prevention by GCSF in a Mouse Model of ALS. *Front Cell Neurosci* 2011; 5: 26.

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130-133.

Nguyen KT, Zhang Z, Barrett EF, David G. Morphological and functional changes in innervation of a fast forelimb muscle in SOD1-G85R mice. *Neurobiol Dis* 2012; 48: 399-408.

Niemann S, Joos H, Meyer T, Vielhaber S, Reuner U, Gleichmann M *et al.* Familial ALS in Germany: origin of the R115G SOD1 mutation by a founder effect. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 1186-1188.

O'Malley JP, Waran MT, Balice-Gordon RJ. In vivo observations of terminal Schwann cells at normal, denervated, and reinnervated mouse neuromuscular junctions. *J Neurobiol* 1999; 38: 270-286.

Okamoto K, Hirai S, Amari M, Watanabe M, Sakurai A. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis immunostained with rabbit anti-cystatin C serum. *Neurosci Lett* 1993; 162: 125-128.

Okamoto K, Mizuno Y, Fujita Y. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 2008; 28: 109-115.

Okamoto Y, Ihara M, Urushitani M, Yamashita H, Kondo T, Tanigaki A *et al.* An autopsy case of SOD1-related ALS with TDP-43 positive inclusions. *Neurology* 2011; 77: 1993-1995.

Okita T, Nodera H, Shibuta Y, Nodera A, Asanuma K, Shimatani Y *et al.* Can Awaji ALS criteria provide earlier diagnosis than the revised El Escorial criteria? *J Neurol Sci* 2011; 302: 29-32.

Palma E, Inghilleri M, Conti L, Deflorio C, Frasca V, Manteca A *et al.* Physiological characterization of human muscle acetylcholine receptors from ALS patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 20184-20188.

Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 710-723.

Piepers S, Veldink JH, de Jong SW, van dT, I, van der Pol WL, Uijtendaal EV *et al.* Randomized sequential trial of valproic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2009; 66: 227-234.

Pioro EP, Mitsumoto H. Animal models of ALS. *Clin Neurosci* 1995; 3: 375-385.

Porter CW, Barnard EA. The density of cholinergic receptors at the endplate postsynaptic membrane: ultrastructural studies in two mammalian species. *J Membr Biol* 1975; 20: 31-49.

Pouget J. [Electroneuromyographic criteria of amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)* 2006; 162 Spec No 2: 4S34-4S42.

Pradat PF, Bruneteau G. [Differential diagnosis and atypical subsets of amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)* 2006; 162 Spec No 2: 4S81-4S90.

Pramatarova A, Laganier J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 2001; 21: 3369-3374.

Pringle CE, Hudson AJ, Munoz DG, Kiernan JA, Brown WF, Ebers GC. Primary lateral sclerosis. Clinical features, neuropathology and diagnostic criteria. *Brain* 1992; 115 (Pt 2): 495-520.

- Pu YM, Tang EY, Yang XD. Trapezius muscle innervation from the spinal accessory nerve and branches of the cervical plexus. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; 37: 567-572.
- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 2006; 9: 408-419.
- Rademakers R, van Blitterswijk M. Motor neuron disease in 2012: Novel causal genes and disease modifiers. *Nat Rev Neurol* 2013.
- Ranta S, Zhang Y, Ross B, Lonka L, Takkunen E, Messer A *et al.* The neuronal ceroid lipofuscinoses in human EPMR and mnd mutant mice are associated with mutations in CLN8. *Nat Genet* 1999; 23: 233-236.
- Rao SD, Banack SA, Cox PA, Weiss JH. BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Exp Neurol* 2006; 201: 244-252.
- Rathke-Hartlieb S, Schmidt VC, Jockusch H, Schmitt-John T, Bartsch JW. Spatiotemporal progression of neurodegeneration and glia activation in the wobbler neuropathy of the mouse. *Neuroreport* 1999; 10: 3411-3416.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF *et al.* Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 1996; 13: 43-47.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR *et al.* A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72: 257-268.
- Rich MM, Waldeck RF, Cork LC, Balice-Gordon RJ, Fyffe RE, Wang X *et al.* Reduced endplate currents underlie motor unit dysfunction in canine motor neuron disease. *J Neurophysiol* 2002; 88: 3293-3304.
- Ringel SP, Bender AN, Engel WK. Extrajunctional acetylcholine receptors. Alterations in human and experimental neuromuscular diseases. *Arch Neurol* 1976; 33: 751-758.
- Rita P. Neurophysiology of extraocular muscles. *Invest Ophthalmol* 1967; 6: 229-234.
- Rivara CB, Sherwood CC, Bouras C, Hof PR. Stereologic characterization and spatial distribution patterns of Betz cells in the human primary motor cortex. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 270: 137-151.
- Robertson J, Sanelli T, Xiao S, Yang W, Horne P, Hammond R *et al.* Lack of TDP-43 abnormalities in mutant SOD1 transgenic mice shows disparity with ALS. *Neurosci Lett* 2007; 420: 128-132.
- Rocha MC, Pousinha PA, Correia AM, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Early Changes of Neuromuscular Transmission in the SOD1(G93A) Mice Model of ALS Start Long before Motor Symptoms Onset. *PLoS One* 2013; 8: e73846.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362: 59-62.

Rouaux C, Jokic N, Mbebi C, Boutillier S, Loeffler JP, Boutillier AL. Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO J* 2003; 22: 6537-6549.

Rouaux C, Panteleeva I, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Dupuis L *et al.* Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Neurosci* 2007; 27: 5535-5545.

Ruegg MA, Bixby JL. Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci* 1998; 21: 22-27.

Ryu H, Smith K, Camelo SI, Carreras I, Lee J, Iglesias AH *et al.* Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurochem* 2005; 93: 1087-1098.

Salpeter MM. Development and neural control of the neuromuscular junction and of the junctional acetylcholine receptor. In: Salpeter MM, editor. *The vertebrate neuromuscular junction*. New York: Alan R. Liss; 1987. p. 55-115.

Salpeter MM, Loring RH. Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscle: properties, distribution and neural control. *Prog Neurobiol* 1985; 25: 297-325.

Sanelli T, Xiao S, Horne P, Bilbao J, Zinman L, Robertson J. Evidence that TDP-43 is not the major ubiquitinated target within the pathological inclusions of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 1147-1153.

Sanes JR, Lichtman JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 389-442.

Sasaki S, Iwata M. Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1996; 47: 535-540.

Sasaki S, Warita H, Abe K, Iwata M. Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol* 2005; 110: 48-56.

Schaefer AM, Sanes JR, Lichtman JW. A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol* 2005; 490: 209-219.

Schmitt-John T, Drepper C, Mussmann A, Hahn P, Kuhlmann M, Thiel C *et al.* Mutation of Vps54 causes motor neuron disease and defective spermiogenesis in the wobbler mouse. *Nat Genet* 2005; 37: 1213-1215.

Schreiber H, Gaigalat T, Wiedemuth-Catrinescu U, Graf M, Uttner I, Muche R *et al.* Cognitive function in bulbar- and spinal-onset amyotrophic lateral sclerosis. A longitudinal study in 52 patients. *J Neurol* 2005; 252: 772-781.

Shan X, Vocadlo D, Krieger C. Mislocalization of TDP-43 in the G93A mutant SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Neurosci Lett* 2009; 458: 70-74.

Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 1995a; 4: 209-216.

Shaw PJ, Ince PG, Falkous G, Mantle D. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol* 1995b; 38: 691-695.

Sherrington CS. The integrative action of the nervous system. New Haven: Yale university Press; 1906.

Sherrington CS, Liddell EGT. Further observations on myotatic reflexes. *Proc Roy Soc* 1925; 97B: 267-283.

Shi L, Fu AK, Ip NY. Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci* 2012; 35: 441-453.

Siciliano G, Carlesi C, Pasquali L, Piazza S, Pietracupa S, Fornai F *et al*. Clinical trials for neuroprotection in ALS. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010; 9: 305-313.

Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joo F, Appel SH. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 39: 203-216.

Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG, Appel SH. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* 2004; 62: 1758-1765.

Sinaki M, Mulder DW. Rehabilitation techniques for patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Mayo Clin Proc* 1978; 53: 173-178.

Slater CR, Lyons PR, Walls TJ, Fawcett PR, Young C. Structure and function of neuromuscular junctions in the vastus lateralis of man. A motor point biopsy study of two groups of patients. *Brain* 1992; 115 (Pt 2): 451-478.

Smith RG, Henry YK, Mattson MP, Appel SH. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1998; 44: 696-699.

Son YJ, Thompson WJ. Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 1995; 14: 133-141.

Son YJ, Trachtenberg JT, Thompson WJ. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci* 1996; 19: 280-285.

Soriani MH, Desnuelle C. [Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)* 2009; 165: 627-640.

Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph A, Roy DN. Motorneurone disease on Guam: possible role of a food neurotoxin. *Lancet* 1986; 1: 965.

Spencer PS, Palmer VS, Ludolph AC. On the decline and etiology of high-incidence motor system disease in West Papua (southwest New Guinea). *Mov Disord* 2005; 20 Suppl 12: S119-S126.

Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, Salachas F, Pradat PF, Le FN *et al.* Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci* 2002; 193: 73-78.

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B *et al.* TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008; 319: 1668-1672.

Stalberg E. Electrophysiological studies of reinnervation in ALS. *Adv Neurol* 1982; 36: 47-59.

Sugai F, Yamamoto Y, Miyaguchi K, Zhou Z, Sumi H, Hamasaki T *et al.* Benefit of valproic acid in suppressing disease progression of ALS model mice. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 3179-3183.

Sugiura Y, Reddy LV, Yang JF, Ko CP. The involvement of skeletal muscles in neurodegeneration in SOD1 mice. Washington D.C. Society for Neurosciences. 2004.

Swash M. Clinical features and diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. In: Robert H.Brown, Meininger V, Swash M, editors. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. London: Martin Dunitz; 2000. p. 3-30.

Tan CF, Eguchi H, Tagawa A, Onodera O, Iwasaki T, Tsujino A *et al.* TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta Neuropathol* 2007; 113: 535-542.

Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 1999; 194 (Pt 1): 1-14.

Tjust AE, Brannstrom T, Pedrosa DF. Unaffected motor endplate occupancy in eye muscles of ALS G93A mouse model. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012; 4: 1547-1555.

Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman OM. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study. *Arch Neurol* 2000; 57: 1171-1176.

Tsujihata M, Hazama R, Yoshimura T, Satoh A, Mori M, Nagataki S. The motor end-plate fine structure and ultrastructural localization of acetylcholine receptors in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 1984; 7: 243-249.

Turner MR, Hardiman O, Benatar M, Brooks BR, Chio A, de CM *et al.* Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2013; 12: 310-322.

Turner MR, Parton MJ, Shaw CE, Leigh PN, Al Chalabi A. Prolonged survival in motor neuron disease: a descriptive study of the King's database 1990-2002. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 995-997.

Uchitel OD, Dubrovsky AL. Electrophysiologic denervation changes of human muscle fibers in motoneuron diseases. *Muscle Nerve* 1986; 9: 748-755.

Umahara T, Hirano A, Kato S, Shibata N, Yen SH. Demonstration of neurofibrillary tangles and neuropil thread-like structures in spinal cord white matter in parkinsonism-dementia complex on Guam and in Guamanian amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 1994; 88: 180-184.

Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, Bird TD, Yuan W, Elman LB *et al.* TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet Neurol* 2008; 7: 409-416.

van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V *et al.* Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med* 2010; 7: e1000245.

van Es MA, Schelhaas HJ, Van Vught PW, Ticozzi N, Andersen PM, Groen EJ *et al.* Angiogenin variants in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2011; 70: 964-973.

van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest* 2007; 117: 2369-2376.

Vance C, Al-Chalabi A, Ruddy D, Smith BN, Hu X, Sreedharan J *et al.* Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain* 2006; 129: 868-876.

Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J *et al.* Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009; 323: 1208-1211.

Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Del GM, V, Yoshikawa M, Hampton TG *et al.* Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav* 2013; 3: 431-457.

Vogel Z, Sytkowski AJ, Nirenberg MW. Acetylcholine receptors of muscle grown in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69: 3180-3184.

Wang FC, De P, V, Gerard P, Delwaide PJ. Prognostic value of decremental responses to repetitive nerve stimulation in ALS patients. *Neurology* 2001; 57: 897-899.

Weber M, Neuwirth C, Thierbach J, Schweikert K, Czaplinski A, Petersen J *et al.* ALS patients with SOD1 mutations in Switzerland show very diverse phenotypes and extremely long survival. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 351-353.

Wettstein A. The origin of fasciculations in motoneuron disease. *Ann Neurol* 1979; 5: 295-300.

Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H *et al.* Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1998; 156: 65-72.

Williams AH, Valdez G, Moresi V, Qi X, McAnally J, Elliott JL *et al.* MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* 2009; 326: 1549-1554.

Williamson TL, Cleveland DW. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 1999; 2: 50-56.

Wohlfart G. Collateral regeneration from residual motor nerve fibers in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1957; 7: 124-134.

Wong M, Martin LJ. Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 2284-2302.

Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA *et al.* An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 1995; 14: 1105-1116.

Xie ZP, Poo MM. Initial events in the formation of neuromuscular synapse: rapid induction of acetylcholine release from embryonic neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 7069-7073.

Xu YF, Gendron TF, Zhang YJ, Lin WL, D'Alton S, Sheng H *et al.* Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J Neurosci* 2010; 30: 10851-10859.

Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH *et al.* Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2008; 11: 251-253.

Yamashita S, Sakaguchi H, Mori A, Kimura E, Maeda Y, Hirano T *et al.* Significant CMAP decrement by repetitive nerve stimulation is more frequent in median than ulnar nerves of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2012; 45: 426-428.

Yang X, Arber S, William C, Li L, Tanabe Y, Jessell TM *et al.* Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron* 2001; 30: 399-410.

Yang X, Li W, Prescott ED, Burden SJ, Wang JC. DNA topoisomerase IIbeta and neural development. *Science* 2000; 287: 131-134.

Yoo YE, Ko CP. Treatment with trichostatin A initiated after disease onset delays disease progression and increases survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2011; 231: 147-159.

Yoshihara T, Ishii T, Iwata M, Nomoto M. Ultrastructural and histochemical study of the motor end plates of the intrinsic laryngeal muscles in amyotrophic lateral sclerosis. *Ultrastruct Pathol* 1998; 22: 121-126.

Younger DS, Chou S, Hays AP, Lange DJ, Emerson R, Brin M *et al.* Primary lateral sclerosis. A clinical diagnosis reemerges. *Arch Neurol* 1988; 45: 1304-1307.

Zacchigna S, Lambrechts D, Carmeliet P. Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 169-181.

Zhang B, Luo S, Wang Q, Suzuki T, Xiong WC, Mei L. LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 2008; 60: 285-297.

Zhang B, Tu P, Abtahian F, Trojanowski JQ, Lee VM. Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *J Cell Biol* 1997; 139: 1307-1315.

Zoccolella S, Beghi E, Palagano G, Fraddosio A, Guerra V, Samarelli V *et al.* Predictors of long survival in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J Neurol Sci* 2008; 268: 28-32.

Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Huguet A, Stone MD *et al.* Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 260-265.

Zu T, Liu Y, Banez-Coronel M, Reid T, Pletnikova O, Lewis J *et al.* RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: E4968-E4977.

XV. ANNEXES

Annexe 1: Primers utilisés pour l'analyse en RT-qPCR

Oligo name	Target refseq name	Sequence	product length
ACTB_F	NM_001101.3	GGAAGTTCGAGCAAGAGATGG	234
ACTB_R		AGCACTGTGTTGGCGTACAG	
B2M_F	NM_004048.2	GGCTATCCAGCGTACTCCAA	97
B2M_R		ATGAAACCCAGACACATAGCA	
HPRT_F	NM_000194.2	ACG-AGC-CCT-CAG-GCG-AAC-CT	164
HPRT_R		CAC-TAA-TCA-CGA-CGC-CAG-GGC-T	
CHRNA1_F2	NM_001039523.2	CGTGACAACCAATGTGCGTCTGA	113
CHRNA1_F2		CCACCCATTGCTCATTCTGCAGATG	
CHRN_G_F	NM_005199.4	AACGAGACTCGGATGTGGTC	119
CHRN_G_R		GTCGCACCACTGCATCTCTA	
MIR206-F2	NR_029713	CTT-CCC-GAG-GCC-ACA-TGC-TTC	80
MIR206-R2		TGC-CGA-AAC-CAC-ACA-CTT-CCT-TAC	
MIR133b-F2	NR_029903	AAA-GAT-GCC-CCC-TGC-TCT-GGC-T	98
MIR133b-R2		GGG-CAT-TGC-CAG-CCC-TGC-TGT-A	
HDAC4_F3	NM_006037.3	CCGGTACTTGTATGTGTTGGTGGGA	150
HDAC4_R3		TGGTCTCGGCCAGAAAGTCCAT	
FGFBP1_F5	NM_005130.4	TCA-GAA-CAA-GGT-GAA-CGC-CCA-GC	397
FGFBP1_R5		GTG-AGC-GCA-GAT-TCC-GGG-CA	